

Libros de **Cátedra**

Vacunas en rumiantes domésticos

Eduardo Mortola y Alejandra Edith Larsen
(coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

VACUNAS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS

Eduardo Mortola
Alejandra Edith Larsen
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



Índice

Introducción	5
---------------------------	----------

PRIMERA PARTE

Generalidades	6
---------------------	---

Capítulo 1

Principios básicos de la respuesta inmune a la vacunación	7
---	---

Eduardo Mortola

Capítulo 2

Generalidades sobre Vacunas en Veterinaria.....	12
---	----

Eduardo Mortola

Capítulo 3

Adyuvantes en vacunas veterinarias.....	32
---	----

Javier Barragan y Alejandra Edith Larsen

SEGUNDA PARTE

Vacunas bacterianas	46
---------------------------	----

Capítulo 4

Vacuna contra Brucelosis bovina.....	47
--------------------------------------	----

Graciela Sara Miceli y Eduardo Mortola

Capítulo 5

Vacuna contra carbunco	56
------------------------------	----

Alejandra Edith Larsen y Javier Barragán

Capítulo 6

Campilobacteriosis genital bovina	71
---	----

Gabriel Eduardo Travería y Mauro Joaquín Manfredi

Capítulo 7

Vacunas contra enfermedades clostridiales	76
---	----

Mauro Joaquin Manfredi y Javier Barragán

Capítulo 8

Vacuna contra la leptospirosis.....	84
-------------------------------------	----

Paula Lorena Martin y Ariel Koval

Capítulo 9

Vacuna contra la Colibacilosis.....	90
-------------------------------------	----

Eduardo Mortola

TERCERA PARTE

Vacunas virales	95
-----------------------	----

Capítulo 10

Vacuna contra la fiebre aftosa.....	96
-------------------------------------	----

Alejandra Edith Larsen y Sergio Rafael Herrera Sampons

Capítulo 11

Vacuna contra la Rabia Paresiante.....	111
--	-----

Graciela Miceli y Eduardo Mortola

Capítulo 12

Vacuna contra Diarrea Viral Bovina	120
--	-----

Gabriel Eduardo Travería

Capítulo 13

Vacuna contra Rinotraqueitis infecciosa bovina.....	127
---	-----

Gabriel Eduardo Travería

Capítulo 14

Vacuna contra el Ectima Contagioso ovino 134

Eduardo Mortola y Emilio Raul Iza

CUARTA PARTE

Vacunas parasitarias 141

Capítulo 15

Vacuna contra Hidatidosis 142

Mauro Joaquín Manfredi y Marcos Daniel Salina

Capítulo 16

Capitulo Complejo de tristeza bovina 148

Mauro Joaquín Manfredi y Juan Manuel Unzaga

Autores..... 155

Introducción

Es sabido que aprendemos a través de una multiplicidad de canales, pero la lectura es considerada básica en la educación superior. El material de lectura referido a vacunas veterinarias ha tenido y sigue teniendo un papel fundamental en el control de “*Una Salud*”, el bienestar animal y en la producción de alimentos.

La vacunología, como parte esencial de la inmunología, es una ciencia en constante evolución y desarrollo, los descubrimientos que surgen a la luz de profundas investigaciones, en poco tiempo se llevan a la práctica y en ocasiones son forzados por catástrofes epidemiológicas como las pandemias. Todo esto conlleva a la necesidad de una continua actualización en los conocimientos que se imparten desde las casas de estudio.

En esta segunda edición del libro “*Vacunas y vacunaciones en rumiantes domésticos*” nos proponemos actualizar los contenidos que ya fueron desarrollados en la primera edición y sumar otras vacunas que consideramos valiosas del interés veterinario. A la fecha, no se cuenta con textos que formulen de manera ordenada, concisa y práctica conceptos básicos de las vacunas y vacunaciones en las especies domésticas y por sobre todo enfocadas en el contexto de nuestro país. Los estudiantes contarán con un material bibliográfico de estudio y consulta con un enfoque completo del tema, que concentre e interrelacione los aspectos epidemiológicos de la enfermedad con los lineamientos de la respuesta inmune, el diagnóstico de la patología y la producción, uso y aplicación de vacunas veterinarias.

PRIMERA PARTE

Generalidades

CAPÍTULO 1

Principios básicos de la respuesta inmune a la vacunación

Eduardo Mortola

Desde Edward Jenner y Louis Pasteur, en los siglos XVIII y XIX, hasta la erradicación de la peste bovina en los vacunos y la viruela en las poblaciones humanas en el siglo XX, las vacunas han desempeñado un papel fundamental en la supervivencia, la salud y el bienestar general de los seres humanos y animales.

El objetivo profiláctico de la vacunación es generar inmunidad humoral y/o mediada por células, induciendo así la producción de memoria inmunológica que confiere protección contra infecciones naturales posteriores. La generación de anticuerpos neutralizantes ha sido durante mucho tiempo el principal objetivo de las vacunas; sin embargo, además de los anticuerpos neutralizantes, se ha demostrado que las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T son cruciales para una protección eficaz contra patógenos de vida intracelular como los virus, ciertas bacterias y parásitos.

La respuesta inmune adaptativa se activa principalmente mediante la presentación de antígenos unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) I o II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC), a los linfocitos T y B dentro de los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, los linfocitos B pueden captar partículas y antígenos sin la ayuda de las APC, siempre que el antígeno sea lo suficientemente pequeño.

El MHC-I se encuentra en todas las células nucleadas, mientras que el MHC-II se expresa exclusivamente en células dendríticas, macrófagos, monocitos, linfocitos B y células epiteliales de las mucosas. Sin embargo, debido a que los linfocitos T no pueden interactuar directamente con el antígeno, el mecanismo de presentación del MHC junto con la señalización apropiada juega un papel fundamental en las células efectoras activadas y es particularmente importante en el desarrollo de vacunas en las que se desea una respuesta mediada por células T. La presentación del MHC depende de la ubicación intracelular del procesamiento del antígeno. Los antígenos derivados del citosol, como en el caso de las células somáticas infectadas por virus, se procesan en MHC-I e interactúan con los linfocitos T CD8+, también conocidas como linfocitos T citotóxicos (CTL), que matan directamente las células infectadas por un proceso denominado apoptosis. Las APC también pueden presentar antígenos adquiridos exógenamente en complejos MHC-II, un proceso denominado presentación cruzada y, al migrar a los ganglios linfáticos, activarán los CTL que migrarán fuera del ganglio linfático para eliminar las células infectadas.

Los antígenos exógenos adquiridos por endocitosis se presentan en moléculas de MHC-II e interactúan con los linfocitos T colaboradores (helper) (TH) CD4 +. Los linfocitos T colaboradores tienen diversos destinos y funciones efectoras que están influenciadas por el tipo de señal provocada durante la presentación y la activación. En lo que respecta a la producción de vacunas, los linfocitos T helper 1 (TH1) producen interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que potencian la función efectora de los macrófagos y aumentan la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, los linfocitos TH1 de memoria inducidos por vacunas se buscan particularmente para patógenos intracelulares.

Los linfocitos T helper 2 (TH2) facilitan la proliferación de linfocitos B al tiempo que antagonizan la diferenciación de TH1 y, por lo tanto, están asociadas con un aumento de las respuestas humorales y son de particular interés para las vacunas dirigidas contra parásitos o respuestas alérgicas. Los linfocitos helper foliculares (TFH) interactúan con los linfocitos B que presentan antígenos en las moléculas de MHC-II. Sólo los linfocitos B que reciben señales coestimuladoras de los linfocitos TFH pueden generar anticuerpos IgG de alta afinidad o madurar hasta convertirse en linfocitos B de memoria. Como tal, las vacunas destinadas a generar una memoria sólida de los linfocitos B también deben estimular las respuestas de los linfocitos T. Las vacunas clásicas inactivadas y vivas modificadas o atenuadas, también conocidas como vacunas de primera generación, han dado ventajas tanto a humanos como a animales sobre el mundo patógeno que los rodea. Estas vacunas también han tenido un impacto económico debido al éxito que se ha visto en las explotaciones ganaderas. Las vacunas inactivadas son seguras y relativamente económicas de producir, presentan predominantemente los antígenos a través de la vía MHC-II e inducen principalmente respuestas inmunes humorales. Debido a esta desventaja, los patógenos que requieren una fuerte respuesta mediada por células pueden escapar a la acción profiláctica de la vacuna.

Las vacunas atenuadas evitan este problema debido a su capacidad para replicarse con éxito dentro del huésped y provocar inmunidad protectora contra los patógenos naturales. Los patógenos atenuados imitan la infección natural, activando así las vías tanto del MHC-I como del MHC-II. Sin embargo, las vacunas atenuadas representan un ligero riesgo para los animales, ya que hubo casos raros en los que cepas atenuadas recuperaron la patogenicidad, provocando la propagación de la enfermedad. Además, estas vacunas están contraindicadas en individuos inmunocomprometidos debido al riesgo de enfermedad. Estas vacunas clásicas han predominado en las inmunizaciones comerciales para humanos y animales durante los últimos 100 años. Sin embargo, las desventajas antes mencionadas han hecho que las vacunas de segunda y tercera generación sean el centro de atención de las investigaciones.

Las vacunas de segunda y tercera generación han tenido éxito en la medicina veterinaria, allanando, en ciertos casos, el camino para el avance de la medicina humana. Las vacunas de segunda generación incluyen las vacunas a subunidades, conformadas por antígenos conjugados/recombinantes o proteínas sintéticas. Las vacunas a subunidades recombinantes no están constituidas por virus (inactivados o vivos), sino por proteínas, los inmunógenos se producen mediante la sobreexpresión y purificación de las proteínas inmunogénicas. Esto se

puede lograr a través de múltiples rutas que incluyen los sistemas de expresión de baculovirus, *E. coli* o *Pichia pastoris*.

Las vacunas a subunidades a menudo carecen de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que el sistema inmunológico utiliza para reconocer patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones. Debido a esto, las vacunas a subunidades necesitan adyuvantes con actividad coestimuladora que mejoren la magnitud y calidad de la respuesta inmune. Además, este tipo de vacunas son generalmente reconocidas por las células presentadoras de antígenos por vía endógena y, en consecuencia, se presentan junto a moléculas del MHC-II.

Las vacunas a vectores virales recombinantes son tecnologías novedosas en medicina veterinaria que utilizan virus como herramientas para la vacunología. Estas vacunas están diseñadas genéticamente e implican la inserción de ADN que codifica antígenos clave en un vector viral. El perfil de seguridad es similar al de las vacunas a subunidades, pero estimulan tanto las respuestas mediadas por células, específicamente las de células T CD8 +, como las respuestas inmunitarias humores. El vector viral de la viruela fue uno de los primeros en estudiarse y establecerse en la década de 1980, y se utilizaron varias estructuras principales para inducir respuestas a diversos patógenos animales, incluidas las de la viruela del canario y la viruela aviar. Los vectores de adenovirus se han explorado como sistemas de tratamiento para numerosas infecciones, e incluso como vacunas contra antígenos asociados a tumores. También se han utilizado alfavirus que contienen ARN de sentido positivo como esqueleto de vector. Para los replicones de alfavirus, se pueden insertar genes extraños de interés en lugar de los genes estructurales que generan replicones de ARN autorreplicantes. Tras la inoculación, los replicones RP son fagocitados por células dendríticas y, en consecuencia, dirigen la traducción de grandes cantidades de proteína en las células, lo que da como resultado la presentación del antígeno. Estos conceptos pueden luego extenderse a vacunas de vectores recombinantes quiméricos, donde los principios son los mismos, pero los genes, y por extensión los antígenos de interés se toman de múltiples tipos del patógeno y se colocan dentro del mismo vector, con el objetivo de provocar una respuesta inmune más amplia. Otro componente que distingue a las vacunas veterinarias de las humanas es la tecnología que permite diferenciar animales infectados y vacunados (DIVA), lo que las convierte en una herramienta fundamental para el control y la erradicación de enfermedades. Esta tecnología también ha tenido un gran impacto en las importaciones y exportaciones, ya que proporciona un método sensible, rápido y económico para determinar rebaños libres de patógenos. La mayoría de las vacunas DIVA o vacunas marcadoras, se basan en mutantes de delección recombinantes de patógenos de tipo salvaje, donde se han eliminado segmentos de genes que expresan proteínas virales. Otras vacunas DIVA se basan en vacunas de subunidades.

Algunas de las principales lagunas en el desarrollo de vacunas son la obtención de inmunidad mucosa mediante la inducción de IgA secretora y la estimulación inmunitaria adecuada del antígeno mediante adyuvantes. La gran mayoría de los patógenos ingresan al huésped a través de

las mucosas, pero la mayoría de las vacunas actuales brindan protección parcial o nula en las mucosas. En medicina veterinaria, las vacunas mucosas han tenido más éxito ya que se utilizan habitualmente vacunas en aerosol y agua potable; sin embargo, no existen vacunas humanas autorizadas para patógenos transmitidos por las mucosas. La inmunidad mucosa inducida por vacunas es particularmente desafiante debido a la dificultad para proteger y preservar la integridad estructural del antígeno y aumentar la biodisponibilidad del inmunógeno en las mucosas. Algunos experimentos han tenido éxito con el uso de formulaciones de nanopartículas mediante la incorporación de polietilenglicol (PEG). El quitosano, un polímero no tóxico, también se ha utilizado en formaciones de vacunas de *Escherichia coli* O157:H7 administradas por vía intranasal con un éxito similar.

Los complejos inmunoestimulantes (ISCOM) son adyuvantes experimentales en forma de jaula esférica compuestos de fosfolípidos, colesterol, saponina y antígenos proteicos y han sido particularmente exitosos en inmunizaciones mucosas, dan como resultado IgA secretora y respuestas inmunes sistémicas. Esta tecnología se ha utilizado en la vacuna contra la influenza equina Equip TM F (producida por Zoetis/Pfizer Animal Health), una vacuna de subunidad que ha demostrado estimular la inmunidad humoral y mediada por células.

Las nanopartículas (NP) son una revolucionaria tecnología de administración ampliamente investigada para medicamentos terapéuticos y vacunas. Caracterizadas por su tamaño (<100 nm), se ha demostrado que varios tipos de NP compuestas de oro, dendrímeros, polímeros de carbono y liposomas mejoran la eficacia de la vacuna. Las nuevas vacunas en medicina veterinaria facilitan la absorción de antígenos e inducen las respuestas inmunológicas deseadas. Las NP ofrecen varias ventajas: pueden acceder directamente a los sistemas de drenaje linfático para el procesamiento inmunológico, pueden modificarse para apuntar a subconjuntos específicos de células inmunes y pueden administrarse a compartimentos intracelulares específicos para concentrarse en vías inmunes específicas. Como tal, gran parte del éxito de la plataforma de vacuna de ARNm contra el SARS-CoV-2 fue el uso de NP lipídicas. No obstante, sigue existiendo una comprensión integral de cómo se pueden utilizar las NP para optimizar la administración de vacunas.

En general, la medicina veterinaria ha logrado grandes avances en el desarrollo de vacunas para una amplia gama de patógenos y ha liderado metodologías y diseños de vacunología, adelantándose, en algunos casos, a las tecnologías de vacunas humanas.

Referencias bibliográficas

- Batista, F.D., Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 9:15–27. doi: 10.1038/nri2454
- Belz, G.T., Carbone, F.R. y Heath, W.R. (2002). Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 22:439– 48. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v22.i5-6.50
- Bernink, J., Mjösberg, J. y Spits H. (2013). Th1- and Th2-like subsets of innate lymphoid cells. *Immunol Rev.* 252:133–8. doi: 10.1111/imr.12034
- Janeway, C.A. (2001). *Immunobiology*. Editorial Garland Science 9th ed. https://www.academia.edu/40521511/Janeways_Immunobiology_9th_Edition
- Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., Mastrobattista, E. y Slütter, B. (2019). Vaccines. *Pharmaceut Biotechnol Fundamental Appl.* 14:281– 304. doi: 10.1007/978-3-030-00710-2_14
- Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W. y Hansbro, P.M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology.* 123:326– 38. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x
- Lung, P., Yang, J. y Li, Q. (2020). Nanoparticle formulated vaccines: opportunities and challenges. *Nanoscale.* 12:5746–63. doi: 10.1039/C9NR08958F
- Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. y Jungersen, G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 20:489–510. doi: 10.1128/CMR.00005-07
- Paillot, R., Fraser, S., Prowse-Davis, L., Rash, N., Montesso, F., Sloomans, N., et al. (2015) . ISCOM-based equine influenza vaccine: duration of immunity and randomised clinical trials to assess an accelerated schedule of immunisation and efficacy. *Trials Vaccinol.* 4:61–70. doi: 10.1016/j.trivac.2015.07.002
- Qin, L., Waseem, T.C., Sahoo, A., Bieerkehazhi, S., Zhou, H., Galkina, E.V., et al. (2018). Insights into the molecular mechanisms of T follicular helper-mediated immunity and pathology. *Front Immunol.* 9:1884. doi: 10.3389/fimmu.2018.01884
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 18:21–5. doi: 10.1080/08998280.2005.11928028
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L. y Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 21:713– 58. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
- Xiang, Z.Q., Yang, Y., Wilson, J.M. y Ertl, H.C. (1996). A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology.* 219:220–7. doi: 10.1006/viro.1996.0239

CAPÍTULO 2

Generalidades sobre Vacunas en Veterinaria

Eduardo Mortola

Las vacunas veterinarias son primordiales para la salud y el bienestar animal, la producción de alimentos y la salud pública. Constituyen un método rentable para prevenir enfermedades en los animales, mejorar la eficiencia en la producción de alimentos y reducir o prevenir las enfermedades zoonóticas y aquellas transmitidas por alimentos. Sería imposible producir suficientes proteínas animales para nutrir a los casi 7 mil millones de personas en la tierra, sin vacunas para prevenir las epizootias en los animales productores de alimentos. Sin las vacunas para animales de compañía (especialmente vacuna contra la rabia), muchas personas no mantendrían una mascota en su hogar y no experimentarían la satisfacción del vínculo humano/animal. Las enfermedades zoonóticas como la brucelosis y la leptospirosis serían mucho más frecuentes sin el uso de vacunas.

Antecedentes

Las prácticas sanitarias que incluyen el uso de tratamientos y medidas profilácticas específicas, como la vacunación, entre otras, contribuyeron en reducir e incluso erradicar algunas enfermedades infecciosas a nivel local de áreas, países, continentes e incluso mundialmente, como es el caso de la viruela.

La vacunación se inicia prácticamente en el siglo XVIII. El médico y biólogo británico Edward Jenner, nacido en 1749, es considerado hoy en día como el padre de la inmunología. Jenner observó que las vacas padecían una enfermedad llamada viruela, que producía erupciones en las ubres semejantes a las que produce la viruela humana. En ocasiones, contagian la enfermedad a las mujeres que las ordeñaban, en quienes aparecían pústulas en sus manos. Por fortuna, era una dolencia de carácter benigno y los afectados se recuperaban rápidamente. Pero lo que verdaderamente llamó la atención de Jenner fue que estas personas se volvían inmunes contra la viruela humana. Por ello, decidió inocular a una persona sana con la viruela de las vacas para conferir inmunidad frente a la terrible enfermedad. En 1796, extrajo pus de una pústula de la mano de Sarah Nelmes, una ordeñadora que había contraído la viruela de su vaca lechera e inoculó a un saludable niño de 8 años llamado James Phipps. El pequeño desarrolló una forma leve de la enfermedad entre el 7º y el 9º día posteriores a la inoculación. Se formó una vesícula

en los puntos de inoculación, que desapareció sin la menor complicación. A los dos meses, inoculó al niño con la temida viruela y no enfermó, había descubierto *“La primera Vacuna”*.

Los científicos de la época, e incluso la Asociación Médica de Londres, se opusieron al tratamiento de Jenner y, en muchas ocasiones, realizaron críticas violentas e injuriosas. Finalmente, su vacunación acabó imponiéndose, aunque hoy en día sus métodos de experimentación serían inaceptables por contravenir los principios de la ética médica. Desde la época de Jenner, pasando por Louis Pasteur, quien inició sus trabajos sobre vacunas sin conocer nada de la inmunología - de hecho, los anticuerpos fueron descubiertos recién treinta años después - y hasta un par de décadas atrás, el enfoque para el desarrollo de vacunas fue casi estrictamente microbiológico. Los microbiólogos identifican primeramente al agente que causa la enfermedad infecciosa y lo atenúan para que cuando se administre como vacuna genere una inmunidad protectora en el individuo sin causarle enfermedad. Interesantemente, este enfoque, que se utilizó durante más de 100 años, no ahonda en los principios por los que estos microorganismos atenuados provocan una inmunidad protectora en el hospedador receptor de la vacuna. Los posteriores estudios en vacunología centraron la atención no sólo en el microorganismo en cuestión, sino en la identificación de los antígenos protectores, los adyuvantes necesarios para provocar inmunidad protectora y los tipos de células B, células T y otras respuestas inmunológicas necesarias para proporcionar una protección eficiente. De este modo, la biología de la vacuna se movió desde un enfoque más o menos empírico hacia uno altamente inmunológico, en el que día a día se trata de delinear una serie de vías fascinantes.

Vacuna y vacunación

Una definición sobre vacuna puede ser amplia y en ocasiones complicada si queremos abarcar todas sus variantes en un sólo concepto. Sin embargo, su sentido inmunológico actual debería encuadrarse en los siguientes términos: toda suspensión de microorganismos en distinto estado biológico, soluciones de sus metabolitos detoxificados, combinaciones de ambos o bien partes estructurales de aquellos, con el agregado o no de adyuvantes, que inoculadas a los vertebrados adultos en las condiciones adecuadas los protegen de la infección, la enfermedad o bien reducen sus consecuencias por inducir un estado de inmunidad activa artificial que se traduciría en una protección sobre el hospedador cuando ese mismo microorganismo penetra por segunda vez.

Vacunar es inocular un producto biológico que, en forma de una agresión controlada, provoca en el huésped un grado de reactividad individual que se traduce, en el mejor de los casos, como una protección eficiente. La finalidad de la vacunación es la protección del individuo, la magnitud de la protección relacionada con su aptitud de respuesta; es por ello que la respuesta inmune inducida nunca confiere protección absoluta ni es igual en todos los integrantes de la población. La protección individual es importante en los animales de compañía o de alto valor económico o afectivo, pero en producción animal, la importancia radica en la inmunidad poblacional.

Es necesario establecer que el éxito o el fracaso de la lucha contra las enfermedades infecciosas no depende solamente de la inmunización efectiva, sino también de otras medidas que la complementan (higiene, aislamiento, ventilación, desinfección, etc.), facilitando el control y erradicación de la enfermedad.

Tipos de vacuna y protección conferida

De acuerdo con el tipo de vacuna elaborada, se puede proteger contra la infección, la enfermedad, atenuar los signos o curar una enfermedad establecida.

- *Proteger contra la infección* refiere a que, por el efecto de la vacuna, se impida el ingreso y colonización del agente infeccioso en el individuo. Sin lugar a duda, es este el objetivo buscado en toda vacuna: involucra la estimulación, por parte de la vacuna, de mecanismos específicos efectores de la inmunidad como es la IgA secretoria que, por su efecto neutralizante y antiadherente, impediría la entrada del microorganismo. Pero la inducción de esta inmunoglobulina por medio de la vacunación necesita de ciertas condiciones esenciales como son: persistencia del inmunógeno, utilizar una vía de inoculación igual o similar a la empleada por el patógeno simulando una infección natural. Ejemplo de vacunas de este tipo en medicina veterinaria es la vacuna contra *Bordetella bronchiseptica* en caninos, viva atenuada de uso intranasal. También vacunas utilizadas en aves.
- *Prevenir la enfermedad*, con este tipo de vacunas no se logra impedir el acceso del agente patógeno, pero sí la aparición de la enfermedad por el efecto de anticuerpos circulantes y/o células específicas que bloquean o eliminan al microorganismo. Estas vacunas se administran generalmente por vía parenteral y son la mayoría de las vacunas que se utilizan en medicina veterinaria.
- *Reducir o atenuar los síntomas*, estas vacunas generalmente relacionadas con afecciones respiratorias, ya sean bacterianas, como la pasteurelosis, o virales, como la influenza equina, las cuales no previenen la enfermedad, pero sí atenúan significativamente los síntomas.

Finalmente, las vacunas terapéuticas o autovacunas que se emplean como tratamiento y que serán definidas más adelante.

Características esenciales de las vacunas

Condiciones básicas que deben reunir las vacunas

Seguridad: posterior a la administración de una vacuna en el hospedador, no deben producirse manifestaciones locales o generales indeseables asociadas con el poder patógeno del microorganismo en cuestión – *las vacunas no deben enfermar* - .

Pureza: ausencia de productos y/o microorganismos extraños en la preparación del biológico (sean o no peligrosos para el individuo, dañinos para el producto o puedan afectar la seguridad, potencia o eficacia de la vacuna).

Potencia: capacidad del producto biológico de generar una respuesta inmune de la magnitud necesaria para proteger al individuo. El ensayo de potencia relaciona la capacidad inmunogénica de la vacuna con la dosis que ha demostrado ser eficaz.

Eficacia: habilidad y capacidad específica de una vacuna en proteger a los vacunados de la enfermedad en cuestión o reducir sus consecuencias, cuando la vacuna es aplicada en condiciones ideales. La eficacia de una vacuna está en función de su inmunogenicidad y duración de la protección conferida, en un determinado lugar y frente al patógeno, administrada en las condiciones estipuladas por el fabricante.

Efectividad: habilidad y capacidad específica de una vacuna en proteger a los vacunados de la enfermedad en cuestión o reducir sus consecuencias en la población objeto, cuando las vacunas son administradas en las condiciones reales o habituales de la práctica diaria asistencial o de desarrollo de programas.

Una buena eficacia no siempre implica una buena efectividad, la efectividad depende de factores como la aceptación, accesibilidad y estado de la población a la vacuna, la correcta administración, conservación y manipulación adecuada del personal entrenado.

Atributos que deben tener las vacunas

Proteger. La protección debe ser prolongada, contra la infección y/o enfermedad, mediante la inducción de una respuesta inmune adecuada que la asegure.

No provocar accidentes vacunales. Las afecciones vacunales son aquellas dependientes del sustrato activo de la vacuna. Ej. Reversión al poder patógeno original de cepas atenuadas; presencia de agentes adventicios; incorrecta inactivación del sustrato, etc. Las lesiones vacunales son reacciones adversas locales o generales, que dependen de otros componentes de las vacunas, que no es el inmunógeno, como adyuvantes, conservantes, etc.

No poseer poder patógeno residual. Sin embargo, algunas vacunas, como la de brucelosis bovina (Cepa 19), produce orquitis en toros por lo que está contraindicado el uso en machos; o la vacuna contra la hepatitis canina (adenovirus canino tipo 1 ADV-1) que producía glomerulonefritis, opacidad de córnea (enfermedad del ojo azul); etc. y se dejó de emplear esa cepa de virus en la formulación de la vacuna.

No deben propagarse los sustratos activos o vivos. No deben excretarse de los animales vacunados por la posibilidad de animalizarse, recuperar su poder patógeno original e infectar.

Ser de bajo costo. Para su aplicación masiva y poder controlar la enfermedad a nivel poblacional.

Clasificación de vacunas

Existen varias clasificaciones de vacunas. Una primera clasificación general las divide de acuerdo a al procedimiento de elaboración en:

- **Vacunas convencionales:** elaboradas con una tecnología tradicional, que no involucra modificaciones genéticas del agente.
- **Vacunas de nueva generación:** las cuales no están formuladas con el microorganismo completo, sino con parte de ellos o modificaciones en su genoma, producto de técnicas de ingeniería genética.

Las vacunas convencionales pueden clasificarse de acuerdo a su sustrato inmunogénico, finalidad, especificidad, valencia, estado biológico y vía de inoculación.

Sustrato inmunogénico

Bacterianas: son vacunas formuladas con bacterias como inmunógenos. Puede ser el soma bacteriano, (ej. leptospira, brucella, etc.); toxinas bacterianas detoxificadas (Ej. toxinas tetánicas); vacunas combinadas con soma y toxinas, también llamadas anavacunas (Ej. gangrenas ovina y bovina); esporovacunas (Ej. carbunco bovino); vacunas formadas por partes o fracciones de las bacterias (Ej. vacuna contra la adenitis equina cuyo sustrato inmunogénico es la proteína M del *Streptococcus equi*; contra queratoconjuntivitis o diarreas neonatales de los bovinos a base de pilis de *Moraxella bovis* y de *Escherichia coli*, respectivamente, etc.).

Víricas: formadas por partículas virales completas (Ej. contra la fiebre aftosa, influenza equina, peste porcina clásica); o por fracciones proteicas del virus, estas últimas generalmente elaboradas por biotecnología y consideradas como vacunas de nueva generación (Ej. contra parvovirus, moquillo, etc)

Parasitarias: el desarrollo de una vacuna eficaz contra las infecciones parasitarias es un desafío, ya que los parásitos tienen ciclos de vida complejos y generalmente pueden evadir el sistema inmunológico de su huésped, utilizando mecanismos que en algunos casos no están totalmente dilucidados. La creación de vacunas eficaces para enfermedades parasitarias es de suma importancia ya que disminuiría la prevalencia de enfermedades en poblaciones humanas y animales (Ej. Hidatidosis en ovinos y Tristeza bovina).

Finalidad

Profilácticas: son las vacunas destinadas a la prevención de una enfermedad, de producción y uso masivo y realizadas generalmente a partir de cepas de referencia o zonales provistas por la autoridad competente (SENASA) (Ej. contra la rabia, aftosa, parvovirus, etc.). El objetivo de estas vacunas es controlar una enfermedad y, en el mejor de los casos, eliminarla o erradicarla.

Metafiláticas: su aplicación tiende a impedir o limitar la difusión de una enfermedad. También se la conoce como vacunaciones de urgencia. Un ejemplo de ella la constituye la vacunación en anillo contra la fiebre aftosa o en mortandades por carbunco.

Terapéuticas: son autovacunas que se elaboran con la o las cepas procedentes de un animal o grupo de animales a los que está destinada la vacuna (Ej. contra mastitis bovina, otitis canina, papilomatosis bovina, etc.). Debemos señalar que algunas vacunas profilácticas también pueden emplearse con una finalidad terapéutica (Ej. vacuna contra la vibriosis en los toros).

Especificidad del inmunógeno

Homólogas: se elaboran con el mismo agente etiológico que produce la enfermedad que se desea prevenir (Ej. leptospirosis, aftosa, distemper canino, etc.).

Heterólogas: producida con microorganismos que, si bien no son la etiología específica de la enfermedad, comparten con ella inmunógenos similares (Ej. adenovirus tipo 2 para prevenir la hepatitis infecciosa bovina).

Valencia del inmunógeno y número de inmunógenos presentes

Monovalentes: presentan un sólo tipo o variedad del agente etiológico específico (Ej. vacuna contra la rabia, brucelosis, etc.).

Polivalentes: incluyen más de un tipo o variedad del agente etiológico (Ej. contra la fiebre aftosa, influenza equina, etc.). Generalmente se identifican por el número de valencias presentes (Ej. vacuna bivalente de encefalomiелitis equina con virus Este y Oeste, vacuna tetravalente contra fiebre aftosa, etc.).

Asociadas o combinadas: son vacunas que llevan 2 o más inmunógenos y protegen contra varias enfermedades (Ej. vacuna contra mancha, gangrena enterotoxemia o la vacuna quintuple en caninos).

Estado biológico

Vacunas vivas atenuadas o modificadas

Consisten en preparaciones de microorganismos que pueden replicar *in vivo* en el hospedador de forma similar al microorganismo nativo, originando una infección inaparente o con signos mínimos, provocando con ello una respuesta inmune, celular y humoral, similar, aunque algo inferior, a la que ocurre en la infección natural. La atenuación del microorganismo mediante pases sucesivos en diferentes hospedadores animales o medios de cultivo o bien la

modificación genética natural, es lo que garantiza la eliminación de la capacidad de inducir enfermedad; pero su gran inmunogenicidad provoca generalmente protección a largo plazo y con un mínimo de dosis.

Las ventajas de estas vacunas son:

- No se alteran sus inmunógenos esenciales.
- Pueden cubrir variaciones antigénicas.
- No requieren adyuvantes.
- Son muy inmunogénicas porque el sustrato se multiplica en el receptor.
- Generan rápida respuesta inmune mediada por anticuerpos y células.
- Pueden estimular respuestas inmunes a nivel de las mucosas, dependiendo de la vía de administración.
- Inducen protección prolongada con una sola dosis.

Las desventajas son:

- Posible patogenicidad residual.
- Presencia de agentes adventicios.
- Riesgo de reversión al poder patógeno original.
- No se recomienda su aplicación en animales preñados, inmunodeficientes o especies salvajes.
- Mayor exigencia para su conservación.
- Pueden propagarse a otros animales.

Vacunas inactivadas

Las vacunas muertas o inactivadas se componen de microorganismos inactivados, térmica o químicamente, o bien fracciones o subunidades de los mismos, incapaces de reproducirse y por ello incapaces de producir la enfermedad en el hospedador o de transmitirse a otro animal. Son vacunas generalmente bien toleradas y seguras. Desde el punto de vista inmunológico, son menos inmunogénicas que las vacunas vivas, requiriendo adyuvantes, la administración de una primera dosis y posteriormente varias dosis de refuerzo tienen por finalidad aumentar y mejorar la protección.

Por lo general, estimulan fundamentalmente la inmunidad humoral y eventualmente con el uso de uno o varios adyuvantes pueden estimular también la inmunidad mediada por células.

Las ventajas de estas vacunas son:

- Son seguras, no causan enfermedad y carecen de patogenicidad residual.
- No hay riesgo de propagación.
- No reversion al poder patógeno original.
- Pueden aplicarse en hembras preñadas y especies salvajes.
- Menos exigentes en cuanto a su conservación.

Las desventajas son:

- Pueden alterarse los inmunógenos esenciales.
- Menor poder inmunogénico que las vacunas vivas ya que carecen de la capacidad de multiplicarse y necesitan mayor concentración de inmunógenos.
- Generalmente la respuesta inmune es sólo mediada por anticuerpos y requieren la incorporación de adyuvantes para aumentar la magnitud y el tipo de respuesta inmune.
- Deben aplicarse varias dosis y por lo tanto pueden producirse fenómenos de hipersensibilidad.

Vía de aplicación

- Naturales: la vía de aplicación son las mucosas (oral, nasal o conjuntival) y el estado biológico debe ser activo o vivo. Al simular la entrada del agente como ocurre en la infección natural, estas vacunas tienen la capacidad de inducir la producción de IgA secretoria, previniendo la posterior infección del animal. Pueden ser de uso individual o masivo sobre todo en aves (vía nasal por aerosoles o vía oral en agua de bebida).
- Parenterales: la vía de aplicación es subcutánea, intramuscular o intradérmica. El estado biológico puede ser vivo o muerto, generalmente inducen la producción de IgM o IgG circulantes y si bien no previenen la infección, impiden el desarrollo de la enfermedad.

Importancia o necesidad de aplicación

- Vacunas core o centrales: son las vacunas destinadas a la prevención de las enfermedades causantes de mayor mortalidad en la especie, en una determinada edad; también se consideran vacunas centrales aquellas destinadas a prevenir enfermedades zoonóticas o aquellas que son obligatorias por disposiciones gubernamentales. Ejemplo de estas vacunas son rabia, parvovirus, distemper canino, aftosa, etc.
- Vacunas periféricas: son todas aquellas vacunas que deben o pueden aplicarse además de las centrales. Es requerida su aplicación, solamente, en aquellos animales cuya ubicación geográfica, ambiente local o estilo de vida los pone en riesgo de contraer infecciones específicas. Ejemplo de estas vacunas son: tos de las perreras, adenitis equina, salmonelosis en bovinos, etc.
- No recomendadas: son aquellas vacunas que, si bien existen en el mercado, no es recomendado su uso por las organizaciones profesionales académico/científicas, por ejemplo la WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*). Este tipo de vacunas no poseen pruebas científicas suficientes que justifiquen su utilización y generalmente son de una disponibilidad o aplicación geográfica restringida.

Vacunas de nueva generación

Introducción

En las últimas tres décadas, la medicina veterinaria ha encabezado el avance en el desarrollo de nuevas vacunas para sortear varios de los defectos asociados con las vacunas clásicas. Estas vacunas de segunda y tercera generación, incluidas las de ADN, ARN y vectores virales recombinantes, inducen una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular, se fabrican de forma económica, son seguras de usar y pueden utilizarse para diferenciar animales infectados de animales vacunados.

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune y las nuevas tecnología de ingeniería molecular y ADN recombinante (ADNr), conjuntamente con el conocimiento más profundo del agente patógeno, llegando a la propia estructura molecular, permitieron identificar en un gran número de agentes infecciosos, las proteínas de interés inmunológico y producirlas en diferentes sistemas; o bien, eliminar aquellas proteínas que no representan interés inmunológico y/o pueden estar relacionadas con la virulencia.

La estrategia para la obtención de estas vacunas de nueva generación se basa en la identificación de la proteína o proteínas de un agente infeccioso, capaces de inducir una respuesta inmune protectora, de forma semejante a la que induciría el agente infeccioso completo; o bien, en la identificación de aquellas proteínas que no tienen interés inmunológico ni replicativo o que pudieran estar relacionadas con la virulencia y no necesarias para la vacuna. De esta manera y mediante técnicas de ingeniería genética, se pueden seleccionar los genes correspondientes, clonarlos y expresarlos en diferentes sistemas o eliminarlos mediante una delección selectiva. Otra variante de este sistema sería, una vez identificada la proteína de interés inmunológico, la obtención de la proteína o proteínas por síntesis proteica.

Otra característica importante en la estrategia de obtención de estas nuevas vacunas es la posibilidad de incorporar, además de las proteínas de interés inmunológico, secuencias de otros antígenos que puedan aumentar la estimulación de la respuesta inmune.

En base a las diferentes metodologías utilizadas (recombinación, delección génica, etc.) o al tipo de producto obtenido (proteínas inactivadas, vacunas atenuadas-delecionadas, recombinantes vivas) se pueden clasificar las vacunas de nueva generación en replicativas y no replicativas. Las replicativas incluyen vacunas vivas delecionadas y recombinantes vivas; las no replicativas, vacunas a subunidades, vacunas a proteínas sintéticas, vacunas anti-idiotipo, vacunas a ADN y vacunas a ARNm.

Existen actualmente a nivel experimental vacunas comestibles. Otra clasificación de las vacunas veterinarias obtenidas mediante tecnología de ADNr las divide en tres amplias categorías, basadas en las propiedades biológicas de los productos y en la bioseguridad que presentan.

La categoría I consiste en productos no viables o inactivos que representan un riesgo muy bajo para el medio ambiente y sin problemas de seguridad. Dichos productos incluyen las vacunas no replicativas, ya sea completas o a subunidades, creados mediante técnicas de ADNr.

Los productos de la categoría II contienen microorganismos vivos modificados añadiendo o eliminando uno o más genes. Son las vacunas replicativas. Los genes agregados pueden codificar antígenos marcadores, enzimas u otros subproductos bioquímicos. Los genes eliminados pueden codificar virulencia, oncogenicidad, enzimas u otros subproductos bioquímicos. La solicitud de aprobación regulatoria correspondiente debe incluir una caracterización de los segmentos de ADN agregados o eliminados, así como una caracterización fenotípica del organismo modificado. Las modificaciones genéticas no deben dar lugar a ningún aumento de la virulencia, la patogenicidad o la capacidad de supervivencia del organismo modificado en comparación con la forma nativa. Es importante que la modificación genética no provoque un deterioro de las características de seguridad del organismo.

Los productos de categoría III utilizan vectores vivos para transportar genes extraños derivados de recombinantes que codifican antígenos inmunizantes inmunodominantes. Los vectores vivos pueden portar uno o más genes extraños que han demostrado ser eficaces para inmunizar a los animales huéspedes. El uso de vacunas de ADN que contienen genes extraños derivados de recombinantes que codifican antígenos inmunizantes (vacunas de ADN plasmídico) constituye un nuevo enfoque para el desarrollo de vacunas. La categorización adecuada de este tipo de producto derivado del ADN se establecerá a medida que se determinen las propiedades biológicas y las características de seguridad. Estas nuevas vacunas pueden encontrar aplicación en una amplia variedad de situaciones, al igual que los productos convencionales.

Vacunas marcadas o vacunas DIVA

El uso del término DIVA (por su sigla en inglés de “Differentiating Infected from Vaccinated Animals”) *-diferenciando animales infectados de vacunados-*, está ampliamente aceptado en la actualidad, no solo en veterinaria, sino también se aplica al campo de la salud pública.

Las vacunas DIVA surgen por la necesidad de establecer medidas de control sanitario animal para erradicar enfermedades, evitando la eliminación de animales no infectados, así como para controlar la posible entrada de enfermedades en países donde las mismas están erradicadas.

En las vacunas tradicionales, la respuesta inmune conferida (principalmente de anticuerpos) es en la mayoría de los casos indistinguible entre animales vacunados y animales infectados. Esta situación dificulta el control y erradicación de las enfermedades en producción animal, además de dificultar el movimiento y exportación de animales y sus productos entre países.

Las vacunas DIVA son capaces de inducir una respuesta inmune protectora eficaz, son más seguras que las vacunas clásicas y permiten discriminar serológicamente entre los animales vacunados y aquellos infectados.

El carácter marcador viene dado por el hecho de que estas vacunas tienen como mínimo, una proteína antigénica o epítipo menos que el agente infeccioso en cuestión. De esta forma la vacuna induce una respuesta inmune sólo frente a los antígenos o epítopes que contiene. Por el contrario, los animales que no están vacunados, pero sí infectados por el agente, inducirá una respuesta

inmune frente a todos los epítopes del agente infeccioso. Así pues, resulta esencial que una vacuna DIVA o marcadora se utiliza en conjunción con una prueba de diagnóstico diferencial.

Dentro de las estrategias utilizadas para crear una vacuna DIVA se encuentran principalmente las vacunas delecionadas, vacunas a subunidades, vacunas ADN, las vacunas basadas en vectores virales que no replican de forma eficiente (defectivas en replicación), las vacunas peptídicas, etc.

Vacunas vivas delecionadas o deleteadas

El avance tecnológico y la ingeniería molecular permitieron el desarrollo de vacunas deleteadas, mediante la identificación en el genoma de ciertos genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad del agente. De esta manera, se crearon en el laboratorio virus y bacterias con modificaciones genéticas donde los genes relacionados con la patogenicidad se encuentran delecionados (eliminados) para conseguir cepas atenuadas de manera estable y segura. Sin embargo, conservan su poder inmunogénico intacto, o sea, su capacidad de generar una respuesta inmune protectora. Las mismas técnicas se utilizan para virus y bacterias, pero en el caso de las bacterias es más complicado debido al gran tamaño y complejidad de su genoma. La primera vacuna creada de este tipo es la de la pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky, que afecta al ganado porcino con severas consecuencias. La segunda enfermedad controlada mediante esta estrategia es la de la rinotraqueítis infecciosa bovina. Ambas enfermedades son ocasionadas por virus muy parecidos del género Herpesvirus. Dentro de los grandes retos que existen actualmente en el desarrollo de este tipo de vacunas es la de la fiebre aftosa.

En la vacuna seleccionada contra la enfermedad de Aujeszky o *-vacuna gE negativa-* se eliminaron los genes que codifican para las glicoproteínas gE relacionadas con la patogenicidad de la enfermedad. Las vacunas producidas con estas cepas inducen buena protección en los animales, pero no inducen anticuerpos frente a la proteína gE, por lo que los animales vacunados con ellas pueden ser diferenciados de los animales infectados, ya que el virus que produce la enfermedad sí presenta la proteína gE.

Los cerdos vacunados con una vacuna deleteada gE negativa desarrollarán anticuerpos frente a todas las proteínas de virus menos contra la gE, mientras que en los animales infectados se detectaron anticuerpos contra todas las proteínas del virus, incluyendo la gE. Estos anticuerpos *-anti-gE-* son diferenciados por técnicas de ELISA indirecto.

Vacunas vivas recombinantes

Las vacunas vivas recombinantes están basadas en la utilización de un microorganismo (virus o bacteria) que actuaría como vector y que por técnicas de ingeniería genética se le adiciona uno o varios genes que codifican proteínas responsables de inducir una respuesta inmune de protección en el animal destino de la vacuna. La estrategia general es expresar antígenos protectores en un vector replicativo, de esta forma, este nuevo microorganismo recombinante puede utilizarse como vacuna (Figura 1).

Este tipo de vacuna presenta 4 características esenciales:

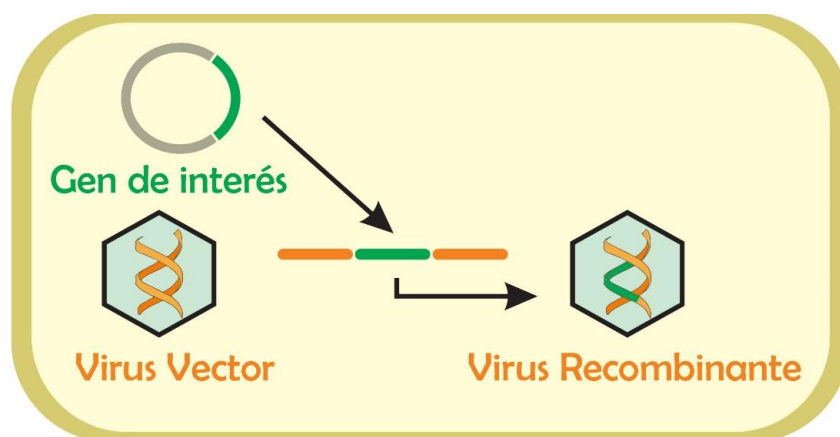
- Se incorpora uno o varios genes que codifican para una o varias proteínas inmunogénicas en el genoma de un microorganismo atenuado que se denomina vector.
- El vector, al replicarse en el organismo receptor, expresa los genes propios y el que produce la proteína incorporada.
- La proteína incorporada se presenta al sistema inmune en su superficie celular.
- Induce respuesta inmune humoral y celular.

El microorganismo que se ha utilizado más frecuentemente como vector de expresión ha sido el virus de vaccinia, ya que dispone de genoma amplio y bien estudiado lo que permite insertar genes extraños sin alterar su replicación. El inconveniente de este vector es que, al ser un virus capaz de infectar la mayoría de las especies animales, incluso al hombre, se obtendría una vacuna viva no específica de especie y por lo tanto susceptible de inmunizar a cualquier animal. Otro vector empleado es la familia de los poxvirus. Ejemplo de esto son las vacunas para Difteria canino y Leucemia felina que llevan adicionados genes que codifican dos proteínas inmunogénicas de los virus mencionados.

Son vacunas que siendo vivas o replicativas son altamente seguras.

Figura 2.1. Estrategia de producción de Vacunas Vivas recombinantes

(Imagen de elaboración propia).



Vacunas a subunidades de proteínas recombinantes

Esta técnica se basa en la producción de una proteína o proteínas de un agente infeccioso sin necesidad del propio microorganismo, mediante técnicas de ingeniería genética se aísla el o los genes en cuestión que se incorporan a los llamados vectores de expresión que pueden ser bacterias, virus o levaduras y de esta manera estos vectores expresan una o de varias proteínas del agente infeccioso. Se produce una o varias proteínas, en cantidad, de un agente infeccioso, que se purifican y pueden ser utilizadas como vacuna de subunidades.

Los vectores de expresión más utilizados son las bacterias, fundamentalmente el *E. coli*, las levaduras como la *Pichia pastoris* y sobre todo virus de insectos llamados baculovirus.

Las bacterias presentan problemas para glicosilar adecuadamente los polipéptidos producidos, por lo que, normalmente, las proteínas obtenidas presentan menor capacidad inmunogénica. La elección de uno u otro vector depende muchas veces de la calidad y tipo de proteína que se necesita como inmunógeno.

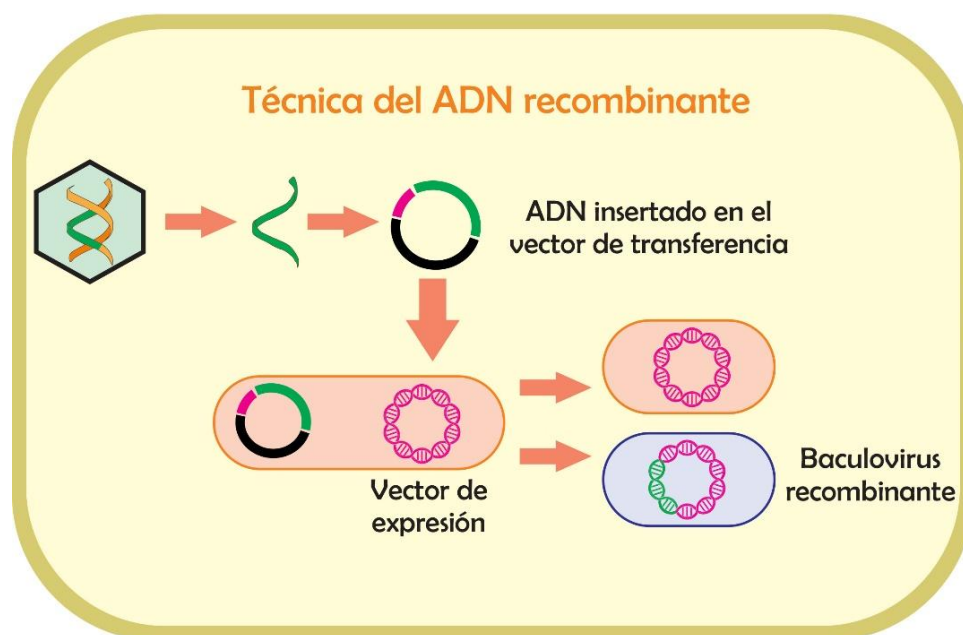
Actualmente, también se incorporaron las plantas como sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Para realizar este tipo de tecnología necesitamos previamente conocer en detalle la estructura de los virus, sus diferentes proteínas, la función de cada una de ellas en la multiplicación viral y fundamentalmente su genoma. Brevemente los pasos de esta metodología son (Figura 2.2):

- Identificar y obtener el gen que codifica para la proteína de interés inmunológico e insertarlo en un plásmido.
- Introducir el plásmido en un vector de expresión (*E. coli*, Baculovirus).
- Aislar y multiplicar el vector de expresión recombinante que contiene el gen de interés.
- Multiplicar el vector recombinante en el sistema apropiado para producir la proteína de interés.
- Purificar la proteína de interés para emplear como posible inmunógeno.

Lamentablemente, en muchos casos, la respuesta inmunitaria obtenida con una vacuna de subunidades es inferior a la obtenida con la vacuna convencional.

Figura 2.2. Estrategia de producción de vacunas a subunidades en Baculovirus
(Imagen de elaboración propia).



Vacunas a proteínas sintéticas

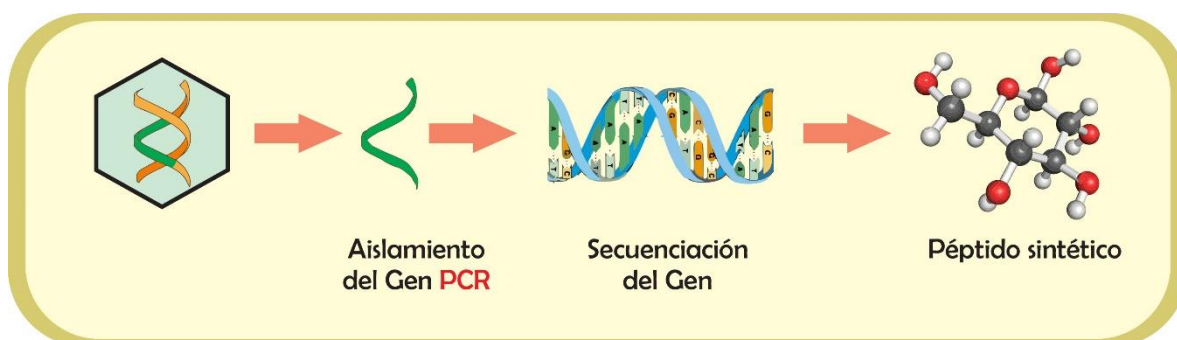
Las vacunas sintéticas consisten en una copia de la secuencia genotípica que codifica para la proteína antigénica del patógeno y su posterior síntesis por medio de métodos químicos. Los

polipéptidos que copian la secuencia primaria de aminoácidos de los epítopes de un microorganismo, estrechamente relacionados con la respuesta inmune protectora.

Mediante ingeniería genética y la utilización de anticuerpos monoclonales, es posible identificar fragmentos con capacidad inmunogénica y posteriormente obtenerlos sintéticamente haciéndolos que adopten una configuración espacial para ser reconocida por el sistema inmunológico del huésped (Figura 3). Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica radica en la dificultad en mimetizar la conformación tridimensional nativa del epítipo, lo que deriva en una dificultad en el reconocimiento antigénico por parte de las células inmunes y por tal motivo una falta de respuesta.

Este tipo de vacunas tuvo un escaso desarrollo y sólo a nivel experimental.

Figura 2.3. Estrategia de producción de vacunas a proteínas sintéticas
(Imagen de elaboración propia).

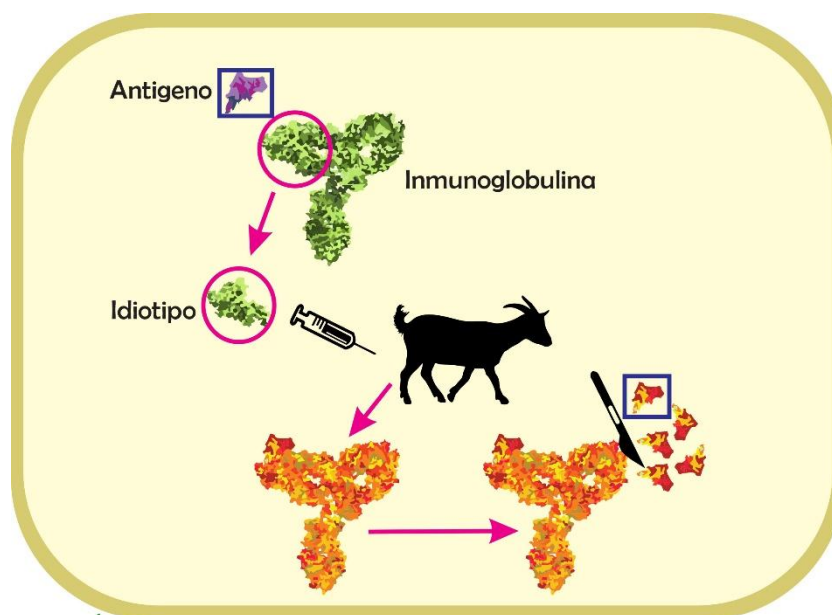


Vacunas anti-idiotipo

El concepto básico de este tipo de vacunas es utilizar en lugar de un antígeno, un anticuerpo que reproduce la morfología del antígeno y que por lo tanto induzca una respuesta inmune, en forma inocua.

Para producirlas, el primer paso es obtener un anticuerpo contra un determinado antígeno, denominado idiotípico, se le purifican las regiones variables de las inmunoglobulinas, que poseen la estructura inversa del epítipo inductor y se inoculan en un animal para estimular la producción de anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos tendrán la misma estructura que el antígeno original y por tanto servirán como antígenos para inmunizar frente al primer antígeno que inició la cadena (Figura 4). Los anticuerpos anti-idiotipo pueden ser policlonales o monoclonales y podrían ser utilizados como vacunas, especialmente en aquellos casos en los que es muy difícil obtener las proteínas, codificar los genes correspondientes a las proteínas de interés inmunológico o cuando el agente patógeno sufre continuas mutaciones.

Figura 2.4. Estrategia de producción de vacunas anti-idiotipo
(Imagen de elaboración propia).



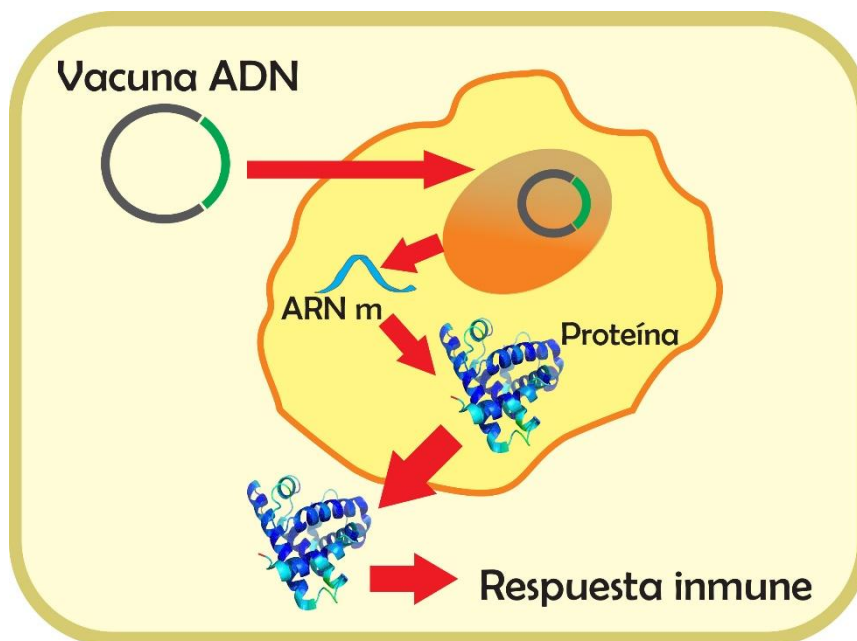
Vacunas a ADN

En este tipo de vacunas, se caracteriza por la aplicación al huésped directamente una porción de ADN purificado que contenga el gen de la proteína que induce la respuesta inmune. Esta respuesta es de tipo humoral y celular al igual que las vacunas vivas atenuadas.

Para este tipo de vacuna, llamadas también vacunas a ADN desnudo, se emplean plásmidos en los que se introduce el gen o genes del patógeno contra el que se pretende inmunizar y que codifican para las proteínas inmunogénicas responsables de inducir una respuesta inmune protectora. Cuando se inyecta el plásmido en el músculo o en la piel, las células del paciente vacunado captan ese plásmido y lo incorporan en su núcleo, permitiendo la expresión del gen foráneo y produciendo la proteína recombinante. Las propias células del cuerpo se convierten en fábricas de vacunas, creando los antígenos necesarios para estimular el sistema inmunitario, simulando una infección natural (Figura 5). En medicina veterinaria hay muy pocas vacunas a ADN, algunos ejemplos actuales son la vacuna de ADNp contra el Virus del Oeste del Nilo, la vacuna de ADNp contra el virus de la necrosis hematopoyética del salmón de criadero y la vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino.

En Medicina Veterinaria, se han desarrollado algunas vacunas de ADN. En vacuno, se han constituido vacunas a partir del gen de la glicoproteína D de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina 1 (IBR-1), el gen que codifica para la proteína G del Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV) y para la proteína E2 del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV).

Figura 2.5. Estrategia de producción de vacunas ADN (Imagen de elaboración propia).



Vacunas a ARNm

Las Vacunas de ARN mensajero son de tercera generación y aprobadas en humanos en un contexto de emergencia sanitaria por la pandemia de COVID-19. Si estas vacunas son ya una realidad, es porque existe el trabajo de la bioquímica húngara Katalin Karikó que desde la década de los '90, investigó la utilización de moléculas de ARN para curar enfermedades.

En comparación con las vacunas convencionales, las vacunas de ARNm tienen un alto potencial de fabricación a bajo costo, desarrollo rápido y entrega segura. La fabricación de vacunas de ARNm no requiere cultivos celulares ni productos químicos tóxicos, lo que resulta en ninguna contaminación química o biológica en los productos finales. El ARNm no se integra en el genoma del huésped y, por lo tanto, no presenta riesgo de mutagénesis por inserción y carcinogénesis. El rápido escalado ofrece oportunidades para abordar de manera efectiva las necesidades emergentes y reemergentes de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, las vacunas de ARNm representan una alternativa prometedora a sembrar el campo de la vacunología no solo humana sino también veterinaria.

Estas vacunas incluyen dos tipos principales: vacunas a ARN no amplificadoras y vacuna de ARN autoamplificadoras.

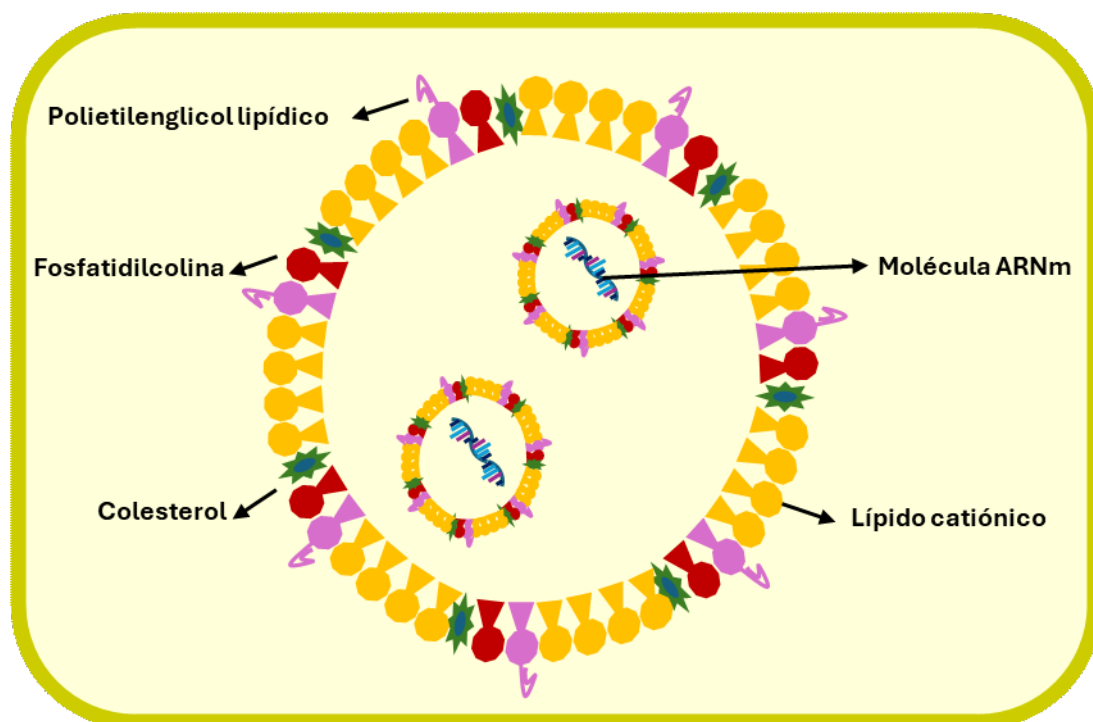
- Las vacunas de ARNm no amplificadoras son el equivalente a las vacunas no replicativas. Al igual que el ARNm natural, la estructura fundamental del ARNm no amplificador tiene una construcción molecular para la producción eficiente de proteínas al estabilizar la molécula de ARNm, pero no existe un aumento del inóculo vacunal.
- Las vacunas de ARNm autoamplificadoras son el equivalente a las vacunas replicativas. Una vacuna de ARN autoamplificador se diferencia en que no amplificador solo codifica genes de interés para la expresión de antígenos, la autoamplificadora contiene genes

adicionales que codifican la maquinaria de replicación del ARN viral para una mayor duración y magnitud de la producción de antígenos, incluso con una dosis mínima de ARN requerida. Ejemplo de esta vacuna a nivel experimental es contra el virus de la encefalitis equina venezolana.

Plataforma de entrega y formulación de vacunas de ARNm

Los sistemas de administración y la formulación de vacunas de ARNm son determinantes clave de la magnitud y duración de la expresión del antígeno de la vacuna, así como la potencia de las respuestas inmunitarias protectoras. Debido a las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de ARNm, como el tamaño grande y la carga negativa densa, el ARNm desnudo apenas pasa a través de la membrana celular. Además, como ácido nucleico exógeno, el ARNm desnudo puede ser reconocible fácilmente por los receptores de reconocimiento de patrones, lo que lleva a respuestas de $\text{IFN}\gamma$ y degradación del ARNm. Por lo tanto, se requiere que el vehículo de entrega promueva captación celular de ARNm y aumentar su resistencia a la degradación por nucleasas, en este sentido, las nanopartículas lipídicas suelen contener uno o más componentes funcionales que son esenciales para la entrega de ARNm (Figura 2.6).

Figura 2.6. La estructura de una nanopartícula de vacuna ARNm con diferentes tipos de lípidos (Imagen de elaboración propia).



Finalmente, se pueden mencionar las vacunas comestibles, se encuentran a nivel experimental, se trata de plantas a las que se les introdujo, mediante técnicas de ingeniería genética, un gen portador de la información necesaria para producir en su interior una proteína antigénica.

Estas plantas, de carácter transgénico, pues se modificaron genéticamente, pueden ser cultivadas de manera natural y consumidas como vacunas comestibles por humanos y animales. Tienen la ventaja de su administración oral, que por ello da lugar a una respuesta inmunitaria mucosa. Su inconveniente es que los antígenos de la vacuna pueden sufrir una degradación en el estómago y el intestino antes de desencadenar la respuesta inmunitaria.

Referencias bibliográficas

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology*. 8ª edición. Philadelphia, USA; Elsevier Saunders.
- Arnon, R. y Ben-Yedidia, T. (2003). "Old and New Vaccine Approaches, International Immunopharmacology". ELSEVIER. *Revista internacional de inmunofarmacología*. 3: 1195-1203.
- Bloom, K., van den Berg, F. y Arbuthnot, P. (2021). Self-Amplifying RNA Vaccines for Infectious Diseases. *Gene Ther.*, 28, 117–129.
- Borja Zamfir, G.M., Ramírez, O.T. y Lara, A.R.. (2014). "Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. *Bio Tecnología*", 17 (3): 87-109.
- Chaudhary, N., Weissman, D. y Whitehead, K.A. (2021). mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Principles, Delivery and Clinical Translation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 20, 817–838.
- Day, M.J., y Schultz, R.D. (2011). *Veterinary Immunology Principles and Practice*. London, UK; Manson Publishing.
- Fiordalisi, M.N., Lim, L.C.L., Kane, K.L. y Folds, J.D. (1999). Active and passive immunization. *Microbiology and Microbial Infections. Bacterial infections*, 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman. pp 107-119.
- Gutiérrez Pabello, J.A. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México DF; Ed. Manual Moderno.
- Hadler, S.C., Redd, S.C. y Sutter, R.W. Immunoprophylaxis of viral diseases. (1999). En: Topley & Wilson (9th edition). *Microbiology and Microbial Infections* (pp 973-988). Bacterial infections. Philadelphia, USA. Ed. William J Hausler Jr-Max Sussman.
- Hunter, P. Vaccination. (1997). *The Control of Animal Diseases in South Africa*. London, UK; Promedia Publications.
- López, M., Mallorquin, P., Pardo, R. y Vega, M. (2004). Vacunas de nueva generación. Informe de vigilancia tecnológica.. Ed: Genoma España. Spainfo, S.A.
- Rankin, R., Uwiera, R. y Babiuk, L.A. (2000). "Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals". *Advanced Drug Delivery Reviews*.43:13-28
- Rodas, J.D. (2006). "Vacunas antivirales de última generación". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*,19 (1): 80-81.
- Roth, J.A.. (2004). Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. 5^{ta} Edición,Tomo 1 (OIE). p 634. Cap. 1.1.7.
- Tregnaghi, M.W., Ceballos, A., y De Arístegui, J. (2005). *Manual de vacunas de latinoamérica* (3ra.). Asociación Panamericana de Infectología.
- Mota-Sánchez, J. (2009). "Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria". *Salud Pública Mex*; 51 (3), 463-469.
- Morrow, J.W. (2012). *Vaccinology: principles and practice*. London, UK; Ed Wiley-Blackwell.
- Orenstein, W. y Picazo J. (2009.). *Vacunas*. 2^{da} Edición. Buenos Aires. pp 1-121.
- Pandey, R. (2011). *Veterinary Vaccines (Progress in Vaccinology)*. Berlín; Ed Springer.

- Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W. y Weissman D. (2018). mRNA Vaccines—A New Era in Vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 17, 261–279.
- Pennimpede, E.F., Gómez, C.M. y Stanchi N.O. (2004). Introducción a la Inmunobiología. La Plata; Editorial de la Universidad de La Plata (edulp) pp 345-653.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. 3^{ra} Edición. Madrid. <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/index.htm>
- Taboga, O., Pérez, O. y Calamante, G. (2012). “Obtención y evaluación preliminar de un virus canarypox recombinante como candidato a una vacuna antirrábica”. *Revista Argentina de Microbiología*, 44: 75-84.
- Tizard, I.R. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8^{va} Edición. Philadelphia, USA; Ed Elsevier Saunders.
- Wang, Y., Zhang, Z., Luo, J., Han, X., Wei, Y. y Wei, X. (2021). mRNA Vaccine: A Potential Therapeutic Strategy. *Mol. Cancer*, 20, 33.
- World Organization for Animal Health (WOAH) Terrestrial Manual 2022. Chapter 1.1.8. Principles of Veterinary Vaccine Production.

CAPÍTULO 3

Adyuvantes en vacunas veterinarias

Javier Barragan y Alejandra Edith Larsen

Introducción

El objetivo de la vacunación es la generación de una inmunidad activa artificial en respuesta a un inmunógeno capaz de dejar protección contra la infección. Para lograr este objetivo a menudo se requiere la adición de un adyuvante. Los adyuvantes tienen como función amplificar la respuesta inmune contra el inmunógeno vacunal que acompañan en la formulación de una vacuna son sustancias que modulan y mejoran la inmunogenicidad del inmunógeno vacunal. La palabra adyuvante se desprende de la palabra latina "*adjuvare*", que significa "ayudar". Fueron descritos por primera vez hace más de 90 años por Ramón, que las definió como "sustancias utilizadas en combinación con un antígeno específico que produce un respuesta inmunitaria más robusta que el antígeno solo". Ramón en 1925 demostró su acción en la búsqueda de sustancias que mejoran la respuestas humoral en caballos que utilizaban para producir sueros hiperinmunes anti toxinas diftérica y toxina tetánica. Desde que Glenny y Freund desarrollaron los primeros adyuvantes, el hidróxido de aluminio y las emulsiones de Freund, respectivamente, que se utilizan hasta ahora, el primero como adyuvante de la mayoría de las vacunas de uso veterinario y humano (para estos últimos en estos hay un gran desarrollo y utilización de adyuvantes de nueva generación), el segundo se utiliza para la demostración de potencia y toxicidad, así como para la producción de sueros hiperinmunes. Los adyuvantes se han obtenido de forma empírica pero las crecientes exigencias de las agencias reguladoras y los avances más recientes alcanzados en la inmunología básica y la toxicología han propiciado que en la actualidad exista una tendencia al diseño racional de los candidatos a adyuvantes, lo cual permitirá lograr productos cada vez más eficaces y seguros.

Los últimos avances logrados en el conocimiento de los mecanismos de la inmunidad innata y su participación en la inducción de la inmunidad específica, particularmente la descripción de los PRR, sus ligandos y los eventos moleculares que conducen a la activación de señales intracelulares, constituyen hoy un pilar importante en el diseño de los adyuvantes, sobre todo para vacunas de uso en humanos.

Normalmente no son necesarios en las vacunas vivas, pero son fundamentales en las vacunas convencionales inactivadas o las de nueva generación no replicativas. Las vacunas convencionales inactivadas tiene un inmunógeno vacunal que fue alterado en su inmunogenicidad natural por los procesos de producción (sobre todo durante la purificación) e inactivación a los que fue sometido, por lo tanto la cantidad y calidad de los PAMPs, así como el microambiente donde son inoculados no generan una respuesta lo suficientemente robusta para inducir una respuesta

inmune de larga duración. En este sentido, las vacunas de nueva generación no replicativas, sobre todo aquellas en las cuales el inmunógeno vacunal está altamente purificado, no inducen respuesta innata y por lo tanto tampoco activan la respuesta adaptativa, son vacunas que necesitan obligatoriamente ser acompañadas por un adyuvante para aumentar su eficacia. A pesar de que existen muchos adyuvantes de nueva generación, muy pocos han logrado ser aprobados, por inocuos o accesibles, para suplantar a los que se utilizan normalmente en las vacunas de uso veterinario. En este tipo de vacunas el costo es un factor crítico ya que la vacunación es parte del manejo de grandes cantidades de animales, en programas de control y erradicación obligatorios en el país, donde los propietarios asumen el costo de la vacunación.

Características generales de los adyuvantes

Los adyuvantes deben cumplir con ciertas características para ser eficaces en su función (Tabla 1). Deben ser estables y seguros ya que los accidentes vacunales causados por su utilización pueden tener impacto en el crecimiento del animal, la tasa de reproducción, confort animal. No deben encarecer el producto a pesar que su utilización abarata el costo de la vacuna ya que su adición permite incorporar menos inmunógeno vacunal a la formulación, y así alcanzar una mayor cobertura de animales vacunados.

Tabla 3.1. Características de un adyuvante «ideal».

Característica	Descripción
Seguro	No debe producir eventos adversos inmediatos o a largo plazo.
Composición química	Debe estar perfectamente definida.
Mecanismo de acción	Debe estar perfectamente definido.
Degradabilidad	Debe ser totalmente biodegradable.
Estabilidad	Debe permanecer químicamente estable por al menos 2 años y con poca probabilidad de variación entre lotes.
Inmunomodulador	Debe inducir una robusta respuesta inmune contra el inmunógeno vacunal, generando un alto porcentaje de protección, a bajas concentraciones de inmunógeno vacunal, en pocas dosis y por diferentes vías de aplicación.
Inmunológicamente inerte	No debe generar respuesta inmune contra sí mismo.
Eficacia	Debe presentar elevada eficacia contra cualquier tipo de inmunógeno.
Producción	De fácil preparación.
Costo	Bajo/económico.

Nota: Modificado de Batista-Duarte et al., 2014.

Por lo tanto no existe un adyuvante universal por lo que deben ser elegidos de acuerdo al criterio veterinario en orden de obtener el mejor balance entre eficacia y seguridad. Existen diversas razones para incorporar adyuvantes en vacunas más allá de incrementar la inmunogenicidad del inmunógeno vacunal: a) incrementar la respuesta inmune específica (seroconversión) en diversas poblaciones con especial interés en aquellas con reducida capacidad de inmuno respuesta, como ocurre en animales lactantes y gerontes, así como en animales inmunodeprimidos; b) facilitar el uso de menores cantidades de inmunógeno en una vacuna y así alcanzar una mayor cobertura de animales vacunados; c) reducir las dosis de vacunas, mejorando su adaptación a planes nacionales de control y erradicación, disminuyendo los requerimientos logísticos y mejorando el costo-beneficio, con un impacto de particular importancia en países subdesarrollados; d) inducir respuesta inmune de memoria de larga duración.

En el siguiente cuadro se enumeran algunos de los factores que se deben tener en cuenta al elegir un adyuvante Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Criterios para elegir un adyuvante

Criterio	Descripción
Sensibilidad de especie	Algunas especies son más sensibles que otras. Bovinos, pequeños rumiantes y aves toleran muy bien adyuvantes oleosos tipo agua en aceite, los cerdos toleran mejor el aceite en agua.
Duración de la inmunidad	Corta duración: apropiados para cría intensiva. Larga duración: apropiados para animales de compañía
Combinación adyuvante/inmunógeno	Extracto crudo: no se justifica un adyuvante oleoso. Es aconsejable hidróxido de aluminio. Proteínas altamente purificadas: necesitan un adyuvante que asegure una respuesta inmune robusta.
Respuesta vacunal efectiva	Determinar qué inmunidad protectora es la adecuada (humoral o celular) según patogenia y características de la vacuna.
Vía de administración	Vía parenteral: hidróxido de aluminio, oleosos, saponinas. Vía mucosa: productos bacterianos como oligonucleótidos sintéticos que contengan CpG dinucleótidos no metilados.

Clasificación

Es muy difícil lograr una única y óptima clasificación de los adyuvantes debido a su diversidad y en muchos casos aún no se conocen los mecanismos de acción. Una clasificación se basa en la naturaleza de los adyuvantes y los divide en adyuvantes de tipo gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados,

proteínas de fusión y lipopéptidos, a los que se suman los inmunomoduladores e inmunoestimulantes como las citoquinas y otros compuestos naturales que activan el sistema inmune innato y que no están incluidos en ninguno de los grupos anteriores.

También se los puede clasificar según qué sustancia actúa como adyuvante. Adyuvantes extrínsecos: aquellas sustancias que no tienen propiedades inmunogénicas *per se*, como aluminio, emulsiones, saponina. Adyuvantes intrínsecos: aquellas sustancias que, además de ser inmunogénicas, exaltan la respuesta inmune contra los otros inmunógenos formulados en la vacuna.

Según su mecanismo de acción se los puede clasificar en: 1) facilitadores de la presentación de inmunógenos; 2) facilitadores de co-estimulación, y 3) facilitadores de la polarización a Th1/Th2.

La última clasificación propuesta es según su función: 1) inmunopotenciadores: sustancias que incrementan la respuesta contra el inmunógeno; 2) sistemas de liberación: compuestos que sirven como matriz para el inmunógeno mejorando el estímulo de la respuesta inmune y 3) inmunopolarizantes.

Mecanismos de acción

Los adyuvantes actúan de distintos modos, tienen función de vehículo específicos de delivery/entrega, o actúan como depósito en el lugar de inoculación para inducir señales de peligro (DAMPs), generando cada uno de ellos una respuesta inmune específica.

En la mayoría de los casos los adyuvantes al ser inoculados causan algún tipo de lesión en los tejidos lo que favorece el reclutamiento de células del sistema inmune que se activan al reconocer patrones moleculares tanto asociados al patógeno como asociados a daño. Una vez que reconocen lo no propio y/o lo propio alterado se activa del sistema inmune innato que según la calidad y cantidad de estímulo activa y modula la respuesta adaptativa. El reconocimiento por parte de los macrófagos residentes en el lugar de inoculación induce una respuesta pro-inflamatoria que resulta en un conjunto de procesos inmunes como el reclutamiento y activación de células del sistema inmune en especial neutrófilos, monocitos y células dendríticas, durante estas procesos de activación-acción del sistema inmune algunas células son inducidas a apoptosis y otras sufren necrosis. Estos sucesos inmunes dan lugar a los signos de inflamación en el lugar de inyección, calor, dolor local, zona colorada por la hiperemia.

Extrañamente y a pesar de su utilización en millones de dosis en vacunas de uso en medicina veterinaria y en humanos, todavía no está totalmente aclarado el mecanismo de acción de los adyuvantes, por el cual potencian la respuesta inmune hacia el inmunógeno vacunal que acompañan en la formulación.

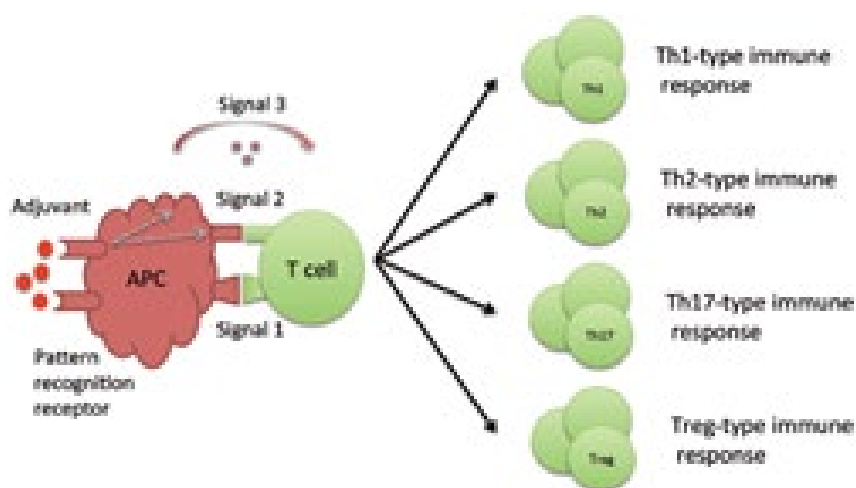
Los adyuvantes tienen varias formas de actuar y en algunos desencadenan una secuencia lógica de eventos inmunes.

Actuando como señal de daño

Como se sabe, los animales domésticos, como cualquier vertebrado superior, presentan un sistema inmune innato y adaptativo. La respuesta innata comienza a partir del reconocimiento de patrones moleculares altamente conservados tanto presentes en los patógenos (PAMPs) y así como moléculas resultantes del daño de tejidos propios (DAMPs). Estos patrones moleculares son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) e informan al sistema inmune innato qué tipo de peligro tiene que afrontar y solucionar. Según la combinación de estímulos, el sistema inmune innato diferencia infección versus traumatismo, infección por microorganismos de vida intracelular versus extracelular, diferencian patógenos virales, bacterias, hongos y parásitos, con el objetivo de montar una respuesta inmune específica y adecuada para su eliminación, reparar el daño y dejar recuerdo de la misma.

La respuesta inmune adaptativa así modulada por la información del inmunógeno vacunal en combinación con el adyuvante, traducida y plasmada en el estímulo que le brinda la inmunidad innata, responde de una manera mucho más específica mediante anticuerpos y linfocitos T capacitados para reconocer secuencias cortas y específicas del inmunógeno (Figura 3.1).

Figura 3.1. Mecanismo de acción de los adyuvantes.



Nota: Modificado de Volker Gerdtz, 2015.

La respuesta inmune adaptativa puede tardar días o semanas en desarrollarse, periodo en el cual la inmunidad innata se mantiene activa como único medio de defensa. Como se muestra en la figura 3.1, la respuesta inmune resultante está determinada por el tipo de señal de daño en sí misma, y se sabe que los adyuvantes actúan como señal de daño modulando la respuesta inmune hacia el inmunógeno vacunal, resultando en una respuesta de larga duración tipo específica: respuesta Tipo Th2 (inmunidad humoral necesaria para combatir parásitos y microorganismos de vida extracelular) o respuesta tipo Th1 (inmunidad celular necesaria para combatir microorganismos de vida intracelular), tipo Th17 (para inducir inmunidad en las mucosas y patógenos extracelulares) y respuesta tipo T reguladora (regulación de la respuesta, supresión de la inmunidad). Por lo tanto dependiendo del tipo de inmunógeno, el microambiente donde se inocule

el mismo y la duración de la estimulación inmune, la respuesta inmune puede durar mucho tiempo, dando lugar a establecer memoria inmune específica. La memoria inmune, en la cual se apoya el fundamento de la vacunación, nos asegura que en un segundo contacto con el mismo inmunógeno (ya sea vacunal o infeccioso) la respuesta sea rápida y más efectiva, tanto la respuesta efectiva como la de memoria. Al vacunar a un animal estamos imitando el primer encuentro con ese patógeno pero sin enfermedad y nos asegura una memoria inmune protectora.

Actuando como vehículo de delivery

La formación de un depósito del inmunógeno vacunal en el sitio de inoculación representa una función importante de algunos adyuvantes, este efecto depot se relaciona con la liberación lenta del inmunógeno y su mejor presentación y reconocimiento por las células procesadoras y presentadoras de antígeno. La mayoría de los adyuvantes de sales de aluminio y las nano y micro partículas actúan por efecto depot. El inmunógeno es atrapado en el adyuvante y su liberación es lenta, pudiendo extenderse días o semanas. En este sentido, también podemos incluir a los adyuvantes oleosos agua en aceite que promueven la optimización del reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígeno. Algunos estudios demuestran lo contrario, pero no existen los suficientes estudios para poder refutar lo explicado en este ítem.

Activación del inflammasoma

Como se explicó anteriormente, los PRR están especializados para reconocer una gran variedad de signos de daño. En las últimas décadas se describieron varias familias de PRR y entre ellos se reconocieron la los NRL por su sigla en inglés de *nucleotide oligomerization domain (NOD) like receptors*, presentes en muchas células del sistema inmune y especializados en el reconocimiento de señales de daño, inclusive estímulos del microambiente que lo rodea, así como estímulo microbiano. El inflammasoma pertenece a la familia de los NLRs e involucra proteínas relacionadas con el reconocimiento de las señales de daño y la subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL1, IL18 e IL33. Se asocia a las sales de aluminio con este mecanismo ya que se les adjudica cierto daño de las células que están en contacto con las sales de aluminio induciendo a necrosis y/o apoptosis.

Adyuvantes como estímulo para la activación y maduración de las células procesadoras y presentadoras de antígeno

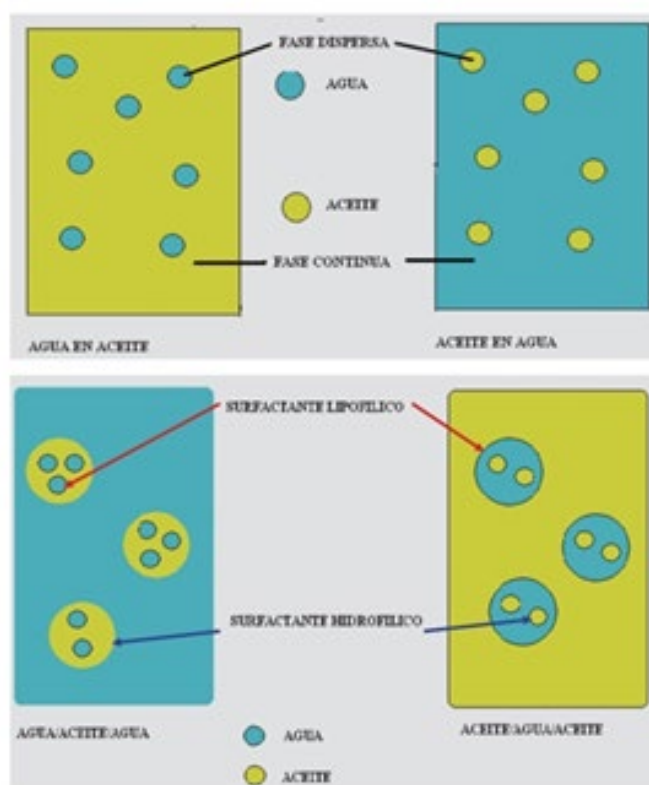
El reclutamiento de células al sitio de inoculación es de suma importancia para que lleguen las células procesadoras y presentadoras de antígeno. Macrófagos y células dendríticas

cas reconocen y endocitan al inmunógeno vacunal, se activan y maduran rumbo a los órganos linfáticos secundarios. Luego de ubicarse en la zona T, donde los linfocitos T CD4 colaboradores y CD8 citotóxico reconocen sobre ellas, y en el contexto del CMH, pequeños péptidos antigénicos resultado del procesamiento del antígeno. Esto representa la señal 1 de activación linfocitaria que desemboca en la proliferación de los linfocitos vírgenes y se transforman en linfocitos efectores antígeno específico que reconocen y eliminan células infectadas (linfocitos T CD8 citotóxicos) y que liberan citoquinas que promueven la diferenciación y maduración de diferentes células de la inmunidad (linfocitos T CD4 colaboradores). Las señales 2 y 3 donde las moléculas de co-estímulo en combinación (señal 2) y en sinergia con las citoquinas (señal 3) modulan la respuesta inmune adaptativa para que sea eficaz y controlar el daño (inmunidad celular para patógenos intracelulares, o inmunidad humoral para combatir a los patógenos extracelulares).

Adyuvantes más utilizados en las vacunas de uso veterinario

Emulsiones

Las emulsiones fueron descritas por primera vez en 1916, pero casi 20 años después fue Jules Freund el que desarrolló el concepto. Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante). Las emulsiones tiene 2 fases, una acuosa, la que contiene el inmunógeno vacunal, y una fase oleosa que representa al adyuvante propiamente dicho. Para estabilizar la mezcla se agregan emulsionantes también denominados surfactantes que son compuestos anfipáticos, presentan una porción hidrofílica (soluble en agua) y otra hidrofóbica (insoluble en agua). Estas moléculas se alinean de tal manera que las partes hidrofílicas quedan de un lado y las partes hidrofóbicas del otro lado. Según el tipo de surfactante se pueden preparar distintos tipos de emulsiones. Cuando el surfactante tiene más afinidad por la fase oleosa, la emulsión es del tipo AGUA en ACEITE, y la fase antigénica está dispuesta en pequeñas gotitas dispersas en la fase oleosa. Aquellos surfactantes que tienen gran afinidad por la fase acuosa generan emulsiones del tipo ACEITE en AGUA, en este caso la fase continua es agua y la fase dispersa es el aceite. Ciertos surfactantes tienen una afinidad intermedia y generan emulsiones más complejas como AGUA en ACEITE en AGUA. La fase continua es agua, compuesta por pequeñas gotitas de aceite dispersas, que a su vez en su interior presentan pequeñas gotitas de agua que contienen al inmunógeno (Figura 3.2).

Figura 3.2. Esquema de las distintas emulsiones y sus componentes

Nota: Modificado de Bernagozzi, 2010.

Los parámetros que determinan la calidad de la emulsión como adyuvante están relacionados no solo con la capacidad de modular positivamente la respuesta inmune frente al inmunógeno vacunal, sino también está relacionado con la eficacia y la seguridad del adyuvante. La eficacia está dada por el poder de mantener estable la emulsión en sí, y los parámetros que se utilizan para establecerlo son: test de la gota, conductividad, tamaño de partícula y estabilidad a diferentes temperaturas. Por otro lado, la seguridad está relacionada con la viscosidad y la capacidad de hacer daño al aplicarla.

Mecanismo de acción

Efecto depósito: según el tipo de emulsión, la liberación del antígeno será más o menos lenta. Un inmunógeno sin adyuvante se dispersa rápidamente, la emulsión aceite/agua permite un ligero retraso en la liberación, pero el inmunógeno es rápidamente liberado al medio. Agua/aceite es una emulsión que libera muy poco inmunógeno o directamente nada. La capacidad de liberar o no del inmunógeno por parte de este tipo de emulsión está relacionada con la estabilidad de la misma, una vez que pierde estabilidad el inmunógeno es rápidamente liberado, aunque más lentamente que en aceite/agua. Freund determinó el efecto depósito al eliminar el inóculo del sitio de aplicación y comprobar que el efecto adyuvante continuaba. Este fenómeno puede ser

explicado por el fenómeno de microdifusión de pequeñas gotitas de aceite desde el sitio de inoculación que son drenados por linfa hacia los órganos linfáticos asociados.

Efecto protector: las emulsiones protegen a los inmunógenos de la degradación enzimática.

Efecto inmunogénico: cambian la carga externa del inmunógeno haciéndolo más inmunogénico.

Mejora el reconocimiento antigénico: induce inflamación con reclutamiento de células procesadoras y presentadoras de antígenos, así como linfocitos. El surfactante mejora el reconocimiento al interactuar con la membrana celular.

Atrapamiento de linfocitos: en el linfonodo estimula el acúmulo de linfocitos retardando la recirculación y favoreciendo la asociación celular.

Los aceites que se utilizan como adyuvantes deben ser seguros. Los adyuvantes oleosos pueden inducir reacciones generalizadas como fiebre o locales como granuloma, absceso. El grado de lesión depende de varios factores como por ej. el origen. Los aceites minerales son una mezcla de diferentes carbohidratos con diferente largo de cadena de carbono, permanecen en el punto de inoculación y son progresivamente eliminados por células como el macrófago.

Emulsiones agua en aceite

Están recomendadas para bovinos y pequeños rumiantes, aves y peces. El ejemplo más paradigmático es el de la vacuna contra la fiebre aftosa, antiguamente se utilizaba como adyuvante al hidróxido de aluminio, que aunque es muy seguro no resultaba muy eficaz dado que se necesitaban mínimo 3 dosis o más por año para proteger a los animales vacunados. Actualmente se utiliza aceite mineral y se mejoró la eficacia de la vacuna teniendo en cuenta que los animales permanecen protegidos por al menos 1 año o en condiciones epidemiológicas favorables se puede extender a dos años. Experiencias en ratones han determinado que los adyuvantes tipo emulsión agua en aceite inducen una fuerte respuesta humoral a IgG2a, así como una respuesta a linfocito T CD8 citotóxico.

Emulsiones agua en aceite en agua

Este adyuvante tiene dos desventajas importantes, el proceso convencional de producción genera un producto no muy estable y conlleva un proceso de dos etapas que genera dificultades al momento de la formulación. Actualmente existen emulsiones agua/aceite/agua producto de un proceso de un solo paso que produce una emulsión más estable, menos viscosa y fácil de formular. Su composición favorece una respuesta inmune rápida y de corta duración, así como de larga duración a la vez. El inmunógeno vacunal incluido en la fase acuosa externa es liberado rápidamente permitiendo una respuesta a los 4 días en la vacuna anti fiebre aftosa. La respuesta de larga duración está mediada por la liberación lenta del

inmunógeno contenido en la fase acuosa interna que es liberado lentamente como ocurre en las emulsiones de agua en aceite.

Emulsiones aceite en agua

Este tipo de emulsión es muy fluida, bien tolerada e induce una respuesta inmune de corta duración. El proceso de producción es muy conveniente ya que requiere un simple mezclado de los componentes. Es una buena opción para las vacunas en cerdos que estén en la etapa de engorde ya que no produce lesiones y no causan alteraciones en la carcasa. Por sus características es muy bien aceptada para las vacunas de equinos y pequeños animales.

El ejemplo más conocido de este adyuvante es el adyuvante completo e incompleto de Freund. Ambos contienen agua en mayor cantidad que aceite y un emulsificante, pero el adyuvante completo tiene bacilo tuberculoso muerto y desecado. La ventaja del adyuvante completo es la excelente respuesta inmune que induce, pero también representa su desventaja al inducir importantes reacciones adversas además de una sensibilización específica hacia el bacilo tuberculoso. Su uso está casi restringido a la primera y única inoculación en planes de hiperinmunización.

Sales de aluminio

El fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio son los adyuvantes más utilizados tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Son muy seguras.

Presentan una estructura física heterogénea compleja a la cual se absorbe el inmunógeno mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El hidróxido de aluminio a pH 7,4 presenta carga positiva y tiene afinidad por las proteínas ácidas, en cambio el fosfato de aluminio es de carga negativa y se une a las proteínas básicas.

Mecanismo de acción

Efecto depósito. Hasta hace poco tiempo se le adjudicaba el mecanismo de acción de efecto depósito, pero la mayoría de los antígenos en contacto con los fluidos intersticiales son rápidamente liberados del gel de aluminio. De todos modos el grado de absorción o atrapamiento que genera el gel de aluminio permite la liberación lenta aumentando la duración de la interacción del inmunógeno con el sistema inmune, mejorando el reconocimiento por parte de las células procesadoras y presentadoras de antígeno.

Actuando como DAMPs. También se le atribuye a las sales de aluminio el efecto de inducir la formación de ácido úrico en la célula con la aparición de DAMPs provocando la activación de las células del sistema inmune. También existen indicios que estimularía al inflammasoma.

Tipo de respuesta adaptativa. Las sales de aluminio se han utilizado con gran éxito en aquellas vacunas que requieren anticuerpos como mecanismo de protección. Generan una buena respuesta tipo Th2, pero tiene poco efecto sobre los linfocitos T colaboradores Th1 y los linfocitos T CD8 citotóxicos, respuesta celular requerida para proteger contra enfermedades causadas por patógenos de vida intracelular.

La seguridad de este tipo de adyuvante es considerada excelente, billones de niños y animales han sido inmunizados con vacunas que contienen sales de aluminio. Los efectos adversos serios son muy raros, aunque se han reportado reacciones alérgicas y casos de granulomas en el punto de inoculación siendo más comunes en la administración subcutánea que intramuscular.

Saponinas

Las saponinas son glucósidos obtenidos a partir de plantas, como la *Quillaja saponaria* en América del Sur. Se utiliza mucho en la industria cosmética y alimentaria como emulsificante. Varias saponinas han sido testeadas y comercializadas para el uso en veterinarias. Aunque no esté muy claro la forma de actuar, tienen función surfactante lo que facilita la penetración de las proteínas a través de la membrana generando una respuesta intracelular. También se la considera una sustancia irritante que podría estar involucrada en la generación de DAMPs.

Este adyuvante se utilizó en diferentes formatos, como extractos purificados, Quil-A (InvivoGen), QS-21 (Cambridge Biotech Corp.) pero también formando complejos con estructura tipo caja denominadas ISCOMs (Immuno Stimulating COMplex), se constituyen por la mezcla de colesterol, fosfolípidos y saponina, que integran al inmunógeno vacunal cuando se lo incorpora a la mezcla.

Las vacunas que se formulan con ISCOM™ han demostrado que promueven la respuesta inmune humoral y celular. Las saponinas preferidas a ser usadas para la formulación de ISCOMs son Quil A o QS21 y el esteroide utilizado es preferentemente colesterol y el fosfolípido usado es generalmente fosfatidiletanolamina.

En medicina veterinaria, la primera vacuna comercial basada en ISCOMs fue diseñada para caballos, y contiene las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa, provenientes de la envoltura del virus influenza. Induce una respuesta inmune de larga duración (alrededor de 15 meses), tanto celular como humoral. En rumiantes se han utilizado de forma experimental en formulaciones contra el virus herpes bovino tipo 1 y el virus de la diarrea viral bovina. Si bien los ISCOMs muestran una actividad adyuvante potente, poseen limitaciones como lo son su costo, dificultad de manufactura, baja estabilidad y se ha observado toxicidad y la aparición de reacciones adversas asociadas a su utilización.

Ligandos de TLR y otras moléculas pequeñas

Como se comentó los TLR son PRRs de señal capaces de reconocer estructuras conservadas que se presentan como patrones moleculares que se repiten en un grupo dado de gérmenes (PAMPs).

La identificación de estos PAMPs induce en la activación de varias vías de señalización de las células inmunes y la consiguiente síntesis de efectores inmunes, moléculas co-estimuladoras y citoquinas. Ejemplo de algunos ligandos de TLR pueden ser LPS, PolyI:C, CpG ODN. La mayoría ha sido experimentalmente probada en varias especies animales como candidatos a adyuvantes. Por ejemplo los oligonucleótidos CpG han probado ser altamente eficaces en cerdos, bovinos así como en animales de experimentación como ratones, simios y monos. En algunas vacunas y en combinación con ligandos de TLR se han incluido pequeñas moléculas como péptidos antimicrobianos y, aunque no se sabe muy bien el porqué, han demostrado efecto adyuvante.

Partículas

Los adyuvantes tipo partícula han sido ampliamente estudiados. Son polímeros sintéticos o naturales con un tamaño pequeño que va de nanopartículas (50-100 nm) a micropartículas (2-5 μ m). El mecanismo de acción está relacionado con la ventaja de vehiculizar y presentar en forma particulada al inmunógeno haciéndolo más fácilmente reconocible por las células procesadoras y presentadoras de antígeno. Se ha experimentado con partículas como el copolímero ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) y polifosfacenos. En medicina veterinaria, de forma experimental, micropartículas y nanopartículas han mostrado ser eficientes en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular en diferentes especies animales.

Liposomas y virosomas

Los liposomas fueron descritos como adyuvantes hace más de 40 años. Son esferas sintéticas fosfolipídicas formadas por capas de lípidos que pueden encapsular antígenos y actuar como sistemas de liberación e inmuno potenciación. Pueden ser usados como sistema de entrega para proteínas, antígenos derivados de péptidos y ácidos nucleicos que codifican antígenos (plásmidos de ADN o ARNm) o bloqueen genes objetivos (siRNA). Los liposomas convencionales son capaces de liberar proteínas en los compartimentos endosomales- lisosomales favoreciendo el procesamiento de estas moléculas en el interior de las CPA y la presentación de los péptidos inmunodominantes derivados del inmunógeno, en las moléculas del complejo MHC II. Se ha observado en diversos estudios que su uso potencia tanto la inmunidad humoral y celular contra antígenos proteicos y polisacáridos.

La potencia de los liposomas dependen de su tamaño, polaridad, número de capas lipídicas, carga eléctrica y el procedimiento de ensamblado. El dolor producido en el sitio de la inyección es probablemente la mayor limitación de algunas vacunas basadas en liposomas.

En medicina veterinaria los liposomas no han sido utilizados de forma masiva, algunos de los ejemplos más importantes de su uso en animales incluyen el estudio de liposomas como nuevos sistemas de entrega de terapia contra el cáncer y vacunas para perros y gatos.

Los virosomas son estructuras unilaminares compuestas por membranas lipídicas y proteínas de membranas virales constituyen partículas vacías a las que se les puede incorporar un inmunógeno y potenciar la inmunidad contra distintas formulaciones de vacunas.

Representan una nueva forma de vacunas que imitan de manera muy exitosa al virus nativo por lo que se las denomina partículas “virus-like” o similares a virus. Se generan mediante la reconstitución de la envoltura viral, sin el material genético del virus

El mecanismo de acción es la estimulación de las CPA. Se unen al ácido siálico de estas células, son endocitados y se produce la fusión del virosoma a la membrana del endolisosoma. El inmunógeno vacunal puede sufrir las dos vías de procesamiento según permanezca en el endosoma (vía exógena de procesamiento) o salga del compartimento al citoplasma (vía endógena de procesamiento).

En general, hasta hoy los virosomas han sido usados en medicina veterinaria y humana preferentemente con fines investigativos. Algunos de los virus estudiados son el virus de la influenza, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus Sendai.

Referencias bibliográficas

- Batista-Duharte A, Lastre M y Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. 2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;32(2):106–114
- Volker Gerdts Adjuvants for veterinary vaccines – type and modes of action. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 128, Heft 11/12 (2015), Seiten 45–463
- Bernagozzi JA, Barragan JH. ADYUVANTES OLEOSOS: definición , características , tipos de respuesta inmune que engendran, reacciones adversas. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Pcia. Bs As.* 82: 59-69. Url:http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicas/infecciosas/comun_varias_especies/82-revista_cvpba_59.pdf
- Coffman R L, Sher A, Seder RA (2010): Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492–503.
- Reed SG, Orr MT, Fox CB (2013): Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19: 1597–1608
- Schwendener RA (2014): Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2: 159–182.
- Garçon A, Leroux-Roels G, Cheng W. Vaccine adjuvants: Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology CHAPTER 4 Volume 1/Issue 1/89e113
- Mutwiri G, Gerdts V, Lopez M, Babiuk LA (2007): Innate immunity and new adjuvants. *Rev Sci Tech* 26: 147–156.
- Gerdts V, Mutwiri GK, Richards J, van Drunen, Littel-van den Hurk S, Potter AA (2013): Carrier molecules for use in veterinary vaccines. *Vaccine* 31: 596–602.
- Marrack P, McKee AS, Munks MW (2009): Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 9: 287–293.
- Takeshi Arakawa (2011) Adjuvants: no longer a 'dirty little secret', but essential key players in vaccines of the future, *Expert Review of Vaccines*, 10:1, 1-5, DOI: 10.1586/erv.10.140
- Coffman R L, Sher A, Seder RA (2010): Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492–503.
- Takeshi Arakawa (2011) Adjuvants: no longer a 'dirty little secret', but essential key players in vaccines of the future, *Expert Review of Vaccines*, 10:1, 1-5, DOI: 10.1586/erv.10.140

SEGUNDA PARTE

Vacunas bacterianas

CAPÍTULO 4

Vacuna contra Brucelosis bovina

Graciela Sara Miceli y Eduardo Mortola

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico, de distribución mundial, que afecta a distintas especies de animales domésticos, de vida salvaje y al hombre. Es de transmisión vertical (60 a 70% de crías de madres con la afección, nacen enfermas) y horizontal entre los animales. Es de importancia en salud pública, debido a los costos generados por la incapacidad física que producen en el enfermo y las pérdidas ocasionadas por la afectación del ganado, ya que disminuye su capacidad reproductiva, produce abortos en el ganado, partos con crías débiles y contaminación de lácteos y carne. La brucelosis del ganado bovino (*B. abortus*), ovino y caprino (*B. melitensis*) y porcino (*B. suis*), son enfermedades que figuran en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y deben ser notificadas de manera obligatoria a la OIE. Es una enfermedad que no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, esto favorece la evolución a la cronicidad.

Datos históricos

- 450 a.C Hipócrates existían evidencias de una enfermedad similar en humanos.
- 1854-1856- Guerra de Crimea fue descrita por primera vez.
- 1859- fue identificado por Marston en la isla de Malta (Fiebre de Malta)
- 1886- Bruce aisló un *Micrococcus melitensis*, del brazo de un soldado en la Isla de Malta.
- 1895- Bang relacionó *B. abortus* con aborto del ganado vacuno.
- 1905- Zammit dedujo que las cabras eran reservorios (relación zoonótica)
- 1920- Evans relaciona a Bruce y Bang y establece el género *Brucella*.
- 1914- Traum aisló *B. suis*.
- 1956- Buddle y Boyce identificaron *B. ovis*.
- 1957-Stonner y Lackman aíslan *B. neotomae*.
- 1968- Carmichel y Brunner descubren *B. canis* en perro.

Agente etiológico

El género *Brucella* pertenecen a la clase *Alfa-proteobacterias*, orden *Rhizobiales*, familia *Brucellaceae*, es un coccobacilo gram (-), son parásitos altamente adaptados a la vida intracelular. Generan una organela donde prolifera, subvierte mecanismos bactericidas de la célula, modula la respuesta inmune del huésped y establece una infección crónica. Inmóviles, de crecimiento lento. No poseen cápsula ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como receptores de electrones. Tiene un lipopolisacárido (LPS) fuertemente inmunodominante, junto con su capacidad de sobrevivir en el interior de las células, constituye uno de los factores de virulencia. Otra característica genética es que presenta una secuencia de dos cromosomas circulares y la ausencia de plásmido, esto último refleja su adaptación al nicho ecológico (ambiente intracelular). Dentro del género se reconocen seis especies clásicas, cada una de las cuales tiene un hospedador principal y sus biovariantes: *B. abortus* (bovinos)(9), *B. canis* (caninos)(2), *B. melitensis* (caprinos)(3), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. ovis* (ovinos) y *B. suis* (porcinos)(5). En los últimos años, han sido identificadas nuevas especies lisas: *B. pinnipedialis* (focas, leones marinos, morsas), *B. ceti* (ballenas, marsopas, delfines), *B. microti* (topillos campesinos), *B. vulpis* (zorros rojos), *B. papionis* (babuinos) y *B. inopinata* (implantes en humanos). Está en estudio una especie aislada de ranas.

Dentro del género de las seis especies clásicas, cuatro eran patógenas para el hombre; éste adquiere la infección a partir de los reservorios animales principales; por ello la brucelosis es considerada una enfermedad zoonótica. La especie no zoonótica hasta hoy es *B. ovis*. *B. neotomae*, era considerada también no zoonótica, pero se aisló de dos casos en Costa Rica, con sintomatología de neurobrucelosis; por la técnica de PCR coincide el patrón genético con esta especie.

En el caso de las bacterias aisladas de mamíferos marinos se ha informado su transmisión al hombre por el contacto con material infeccioso en el laboratorio y no se puede descartar un posible contagio por el consumo de carne cruda de mamíferos marinos.

Patogenia

La enfermedad es asintomática en las hembras no gestantes, cuando las bacterias ingresan en el organismo, son fagocitadas por los neutrófilos y monocitos y transportados por vía hematológica a los sinusoides del hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, donde se multiplican en los macrófagos, los que juegan un rol central en la respuesta inmune, ya que no solo procesan y presentan antígenos, sino que la supervivencia de la *Brucella spp* dentro de ellos está asociada a proteínas citoplasmáticas de la bacterias, entre ellas la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa, la SOD forma parte del sistema antioxidante de la bacteria, el cual la protege de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma el superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno gaseoso, la catalasa ayuda a SOD a detoxificar el ambiente bacteriano, la expresión de estas enzimas favorecen

la permanencia en el interior del fagocito. En las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto entre el quinto y noveno mes de gestación, incluso en ausencia de aborto se produce una gran excreción de microorganismos a través de la placenta, los líquidos fetales y los exudados vaginales; como difusor de la enfermedad es también el hábito de las hembras de lamer los recién nacidos o los fetos abortados; las mamas y ganglios regionales pueden infectarse, con aparición de bacterias en la leche; las gestaciones posteriores llegan a término, pero la infección uterina y la mamas repiten la eliminación de microorganismos. Los machos pueden desarrollar orquitis, epididimitis, dermatitis escrotal, elimina bacterias por semen, que ha demostrado ser una vía importante de transmisión cuando se utilizan programas de inseminación artificial, puede también eliminar por orina, se pueden presentar higromas (acumulación de líquido en las articulaciones de los miembros anteriores o posteriores, motivo que le impide el servicio natural). *Brucella* spp puede causar esterilidad en ambos sexos. Los terneros nacidos de madres infectadas pueden eliminar bacterias por materia fecal, son los denominados silentes, los cuales son potenciales enfermos en la adultez.

En equinos ocasiona lesiones caracterizadas por inflamación y abscesos localizados a la altura de la nuca, se conoce como “Mal de la Cruz”.

B. ovís afecta exclusivamente al ovino y produce un cuadro que es la “Epididimitis del carnero”.

En los cerdos se considera venérea.

Epidemiología

La brucelosis es una zoonosis, se asocia frecuentemente a la población rural, afectando también a personas que están expuestos como veterinarios, laboratoristas y empleados de frigoríficos. En Argentina las principales especies responsables de enfermedad en el hombre son *B. suis* y *B. melitensis*.

Presenta dos patrones epidemiológicos:

1) patrón urbano-alimentario, por consumo de leche y quesos no pasteurizados, más casuística en hatos caprinos.

2) patrón rural-laboral, por exposición profesional al ganado infectado o sus productos, sea por contacto o inhalación. En este caso tiene una cierta tendencia estacional, generalmente ocurre en primavera y verano, que es el período de reproducción de los animales. La forma de eliminación, por lo emuntorios, en el parto o aborto completa el ciclo infeccioso, asegurando la contaminación de otros animales, por la gran cantidad de bacterias que se expulsan al medio, la persistencia del germen en la naturaleza, que se da porque pueden sobrevivir y mantener la capacidad infectante durante períodos de tiempo variables, relacionados a las condiciones del medio en el que sean eliminadas, especialmente en condiciones de frío y humedad.

Puede transmitirse al ser humano, aun con la piel intacta.

Es importante la enfermedad en la fauna salvaje, la presencia de este reservorio complica la erradicación de la afección.

Respuesta Inmune

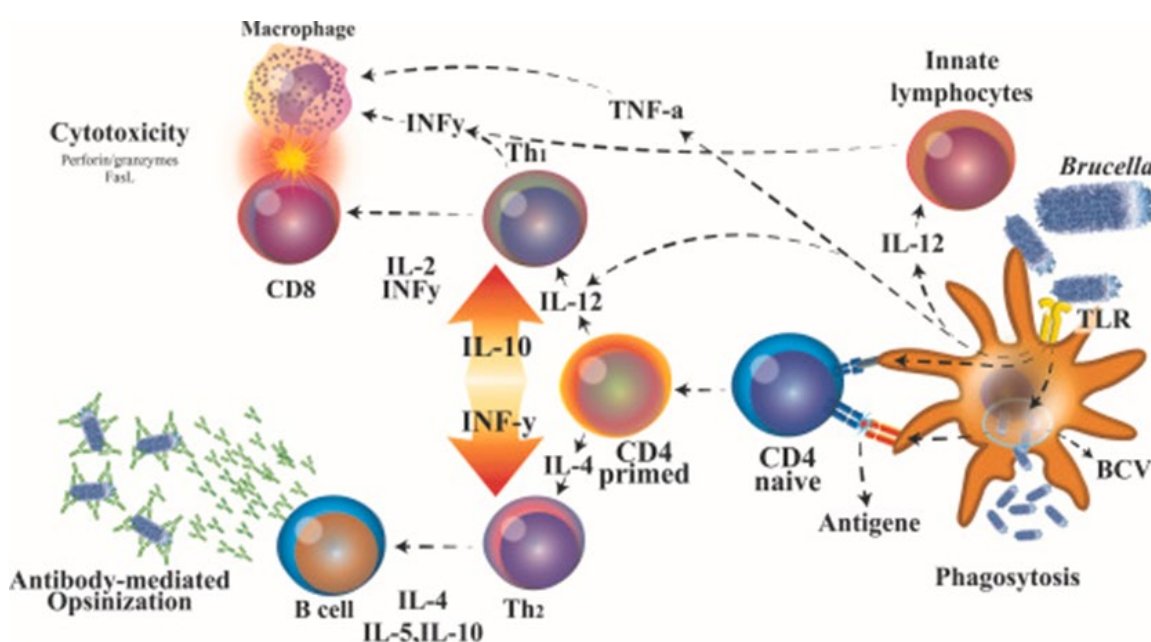
Cuando ingresa *Brucella* al organismo:

Inmunidad innata (II): trata de reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta mediante: 1) los macrófagos, el ingreso de la bacteria se produce a través de la interacción entre el receptor de tipo Toll 4/MD2 (proteína asociada al dominio extracelular de Toll 4) complejo, que une el lípido A a la molécula de CD14 y el LPS, que a su vez, induce la producción de IL12 estimulando las células NK y linfocitos LTh, que secretan INF γ favoreciendo la respuesta LTh1, la cual estimula la respuesta celular. 2) Los neutrófilos tienen la capacidad de transportar las bacterias a los tejidos linfoides. 3) Células “*natural killer*” (NK) y linfocitos $\gamma\delta$ parecerían ser relevantes en la inmunidad frente a *Brucella* spp. El número de células T $\gamma\delta$ aumenta en sangre periférica de pacientes con brucelosis aguda y declina luego de un tratamiento exitoso y el Complemento (C') es responsable de la lisis de *Brucellas* spp mediada por la vía clásica, que puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS.

Los receptores Toll son importantes en la II, inducen señales intracelulares que activa al factor NF-kB, modulando la producción de citoquinas. El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar linfocitos B (LB) sin la participación de lo LTh, generando IgM.

Inmunidad adaptativa (IA) se basa en tres mecanismos: 1^{ero} el INF γ , producido por células TCD4, CD8, NK, Linfocitos $\gamma\delta$, es una de las citoquinas que activa la función bactericida en macrófagos, inhibiendo la supervivencia intracelular de las bacterias, 2^{do} la citotoxicidad de las células T CD8 que eliminan células infectadas mediante la interacción Fas-FasL o secreción de perforinas y granzimas T CD8 y 3^{ero}. Producción de anticuerpos, isotipos IgG2a e IgG3 que oponizan al patógeno para facilitar la fagocitosis. El TNF α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados.

Figura 4.1. Respuesta inmune en Brucelosis



Diagnóstico

El diagnóstico de Brucelosis se realiza siguiendo las pautas oficiales del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Estos documentos proporcionan procedimientos para realizar pruebas de diagnóstico, interpretar los resultados y tomar las medidas adecuadas en caso de detectar la enfermedad. Se describen los siguientes métodos:

1) Métodos directos (diagnóstico bacteriológico y molecular)

2) Métodos indirectos (Diagnósticos inmunológicos –serológicos)

1) Aislamiento bacteriológico: material proveniente de aborto, material de necropsia, bazo, útero, ubre. En machos muestras de testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales y semen.

Recolectar en frascos o bolsas estériles.

Hisopos en solución fisiológica estéril.

Es un diagnóstico más costoso, lento y requiere de personal adiestrado.

El diagnóstico por PCR es muy utilizado, pero no es aplicable a un gran número de muestras. Se puede realizar a partir de un cultivo o a través de muestras de campo como leche, semen, sangre entera, suero y tejidos.

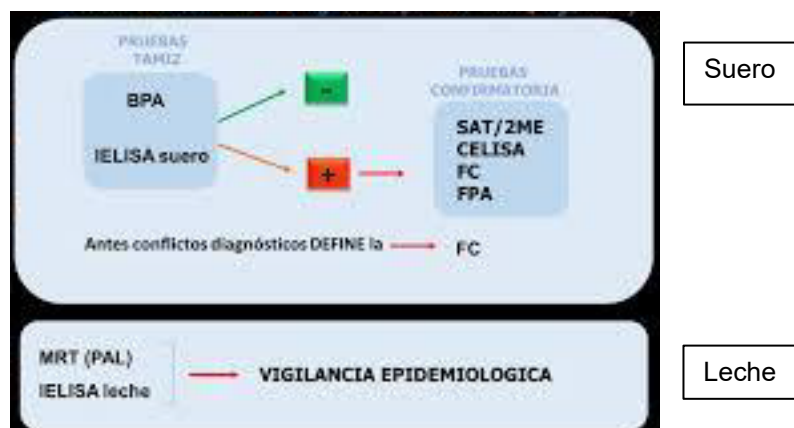
2) En bovinos el diagnóstico de rutina es por Serología. Las pruebas son útiles cuando se usan con criterio epidemiológico. Se utiliza **suero** y también **leche** sin congelar para la prueba de anillo en leche (PAL) o congelada para ELISA.

En el diagnóstico de brucelosis es importante conocer la cinética de las inmunoglobulinas, las que se diferencian si el animal está cursando la infección o si son anticuerpos vacunales.

Las pruebas serológicas se pueden clasificar como (Figura 4.2):

- 1) Pruebas tamiz (operativas y de rutina).
- 2) Complementarias / confirmatorias
- 3) De vigilancia epidemiológica

Figura 4.2. Pruebas Oficiales de SENASA



Vacunación

La prevención de la diseminación de *Brucella* spp se basa en la aplicación de la vacuna, en nuestro país, se utiliza la cepa S19, se cree que proviene, aunque hay alguna controversia en la bibliografía, de un aislamiento en 1923 a partir de leche de vaca, era una cepa virulenta, se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 año en el laboratorio, obteniéndose bacterias atenuadas. Tiene ventajas y desventajas, el mayor inconveniente es la producción de anticuerpos que pueden confundir el diagnóstico. **Es una vacuna viva atenuada.**

La vacuna con cepa 19S **protege contra el aborto y la infección**, las dosis aplicables a las hembras son de $15-30 \times 10^{10}$ células de *Brucella abortus*, por dosis de vacuna, se aplica 2ml, por vía subcutánea. **No se vacuna a los machos.**

El período de aplicación de la vacuna es entre **los 3-8 meses, preferentemente 6 meses**, variando el tiempo de negativización de acuerdo con el momento de la vacunación, si se vacunan a los 3 meses, sucede a los 2 meses posteriores, a los 6 sucede 6 meses posteriores y si se realizara a los 9 meses (fuera de lo permitido) aparecen anticuerpos hasta los 15 meses, considerando ese individuo sospechoso. Se realiza la vacunación considerando el momento del servicio, que es a los 18 meses.

Método de Producción y Controles, sigue los lineamientos de las vacunas vivas atenuadas. (Cap.1).

Respuesta Inmune a la Vacunación

Al ser una vacuna viva atenuada, produce respuesta celular y humoral, siendo la respuesta celular la más importante.

En respuesta a la vacunación, se producen anticuerpos de las clases IgM e IgG, las IgM son las primeras en aparecer, se detectan entre 5-7 días post vacunación, alcanza su pico a las 2-3 semanas, posteriormente decrece su concentración, sin desaparecer por varios meses, las IgG se producen más tarde, entre 14-21 días y alcanzan su máxima concentración entre los 28-42 días, declina rápidamente y desaparecen antes que IgM; las IgG que se producen son IgG₁ e IgG₂, siendo la IgG₁ las más abundantes en suero y supera la concentración de IgG₂, lo mismo sucede en el enfermo crónico, en el animal infectado la secuencia en la producción y persistencia tiene una diferencia, las IgG desarrollan el nivel más alto y persisten más tiempo, por un estado activo y progresivo de la enfermedad o, en caso de cronicidad, a medida que progresa la infección, la IgM tienden a desaparecer, la repetición del estímulo o la vacunación hace que la IgG por la memoria inmunológica se sintetice más rápida y eficazmente, en tanto IgM se comporta como un estímulo primario simple, ya que no posee memoria. La IgG₁ disminuye en el período próximo al parto, debido a la movilización hacia el calostro, en la leche del animal enfermo aparecen también IgM e IgA de origen local.

Nuevas Vacunas contra Brucelosis:

Vacunas Subcelulares

Vacuna Delta-pgm:

Se trabajó identificando y caracterizando un gen que codifica la enzima fosfoglucomutasa (pgm) de *B.abortus*, la cual cataliza la interconversión reversible de glucosa -6-fosfato a glucosa -1-fosfato. Se generó una mutante por delección no marcada en dicho gen. La cepa generada es de fenotipo rugoso, incapaz de sintetizar el glucano β 1,2 cíclico, importante factor de virulencia es protectora y no interfiere con las pruebas serológicas. Se hicieron pruebas piloto en bovino. Esta vacuna se realizó el desarrollo en Argentina, pero no se usa aquí. Se transfirió la tecnología a otros países.

Vacunas de proteína recombinantes:

Investigadores argentinos están trabajando con proteínas recombinantes de *Brucella spp*, éstas son iguales a las proteínas que están normalmente en la bacteria, pero obtenidas en el laboratorio mediante técnicas de biología molecular, consiste en un método por el que transfiere un gen de la *Brucella spp*. a otra bacteria más amigable y suficientemente entrenada para trabajar en el laboratorio, ésta fue la *Escherichia coli*, que una vez que tiene inserto el gen "ajeno" comienza a producir la proteína de interés como si se tratara de la otra bacteria, la *Brucella spp*, de este modo, los científicos obtienen la proteína que necesitan, la purifican y pueden efectuar los ensayos de laboratorio. Por técnicas moleculares, se encontró que quienes ofrecían mayor protección a los animales del estudio eran dos: las proteínas brucella lumazina sintetasa (BLS) y OMP31, basándose en la estructura de la BLS, le agregaron una parte de la OMP31, construyeron una proteína que es quimérica entre las dos.

Los niveles de protección que se lograron con esta vacuna fueron mayores contra *B. ovis* o similares contra *B. melitensis*, que los que se obtienen con las cepas de bacterias atenuadas utilizadas normalmente.

La vacuna que desarrollaron y ensayaron los investigadores argentinos es del tipo vacuna de ADN, ésta vacuna de ADN consiste en inocular en los animales que se desea proteger el gen de la bacteria *Brucella spp*, que codifica para la proteína de interés. De esta manera se logra que el animal vacunado produzca por sí mismo la proteína.

Aplicación y precauciones en su uso:

Dado que la vacuna es una cepa viva atenuada, ésta debe conservarse y trasladarse manteniendo una adecuada cadena de frío. Una vez reconstituida debe homogeneizarse adecuadamente, sin generar espuma y aplicarse inmediatamente, o que transcurra el menor tiempo posible desde la reconstitución hasta la aplicación. Debe respetarse estrictamente el uso del **líquido diluyente** que acompaña la vacuna. Cualquier cambio puede generar la muerte de las bacterias y alterar el número necesario para una buena respuesta inmunitaria.

Los frascos vacíos deben incinerarse o esterilizarse por ebullición durante 10 minutos o descartarse en recipientes para tal fin. Se recomienda el uso exclusivo de jeringas para la vacunación de las terneras con cepa 19.

Programa de Brucelosis bovina

Define estrategias y acciones a desarrollar en todo el territorio nacional, en el marco del Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina¹, con el objetivo de consolidar en forma progresiva la condición de áreas libres de enfermedad.

Las actividades del Programa incluyen:

- Vacunación
- Control de Egresos
- Vigilancia Epidemiológica
- Estatus sanitario de los establecimientos.

Vacunación en caprinos

Vacuna REV-1: la cepa fue aislada de una placenta de un aborto de una oveja. Se recomienda vacunar en los períodos de cría o durante la lactancia para prevenir aborto. Es una vacuna viva atenuada, estable, produce aborto si es aplicada en hembras gestantes, se excreta en leche e interfiere con la serología. Es una cepa mutante estreptomicina dependiente, proviene de la cepa *Brucella melitensis* 6056, produce cuando se inocular, al igual que la cepa 19 una infección controlada.

Se usa solamente en zonas endémicas como Mendoza, San Juan, Catamarca, y el este de Salta, que adhirieron al plan de vacunación coordinado por SENASA.

A partir del 14 de junio de 2017, por Resolución 372-E/2017, se aprobó el **Plan Nacional de Control de Brucelosis Caprina en la República Argentina**, donde quedan explicitadas todas las condiciones para el manejo de los hatos, aplicación de la vacuna REV-1, movimientos y todo lo relacionado al Control.

Para las zonas endémicas del país, se establece la aplicación de la vacuna *B. melitensis* Rev-1 de manera masiva y sistemática en la población caprina y ovina, por vía conjuntival, cada dos años en cada establecimiento (Boletín oficial).

¹ Para acceder, ingresar al siguiente link: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-67-2019-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

Referencias bibliográficas

- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. y Verger J.M. (1988). Techniques for the brucellosis. Laboratory. INRA, Paris.
- Castro, A.H., Gonzalez, S.R. y Prat, M.I. (2005) Brucelosis: una Revisión Práctica .Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39 (2), 203-16 .-<http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v39n2/v39n2a08.pdf>
- Comerci, D., Ugalde, J., Del Vecchio, V. (2008) Delta-pgm: Vacuna contra Brucelosis. Universidad de San Martín. 11B.Intech.
- Estein, S.M. (2006). Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista Electrónica de Veterinaria. (REDVET). Vol. VII, Nº 5. 1-25. Mayo.- <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Documentos%20novedades/Senasa/Documentos/apunte%20curso1.pdf>
- Favero, V., Spirito, M.F. y Zappa, V. (2008). Brucelosis bovina. Revista científica electrónica de Medicina Veterinaria. ISSN:1679-7353.Año VI. Nº11.
- Garcia-Carrillo, C. (1987). La brucelosis de los animales en América y su relación http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03.%20Brucelosis%20bovina.pdf la infección humana. O.I.E.
- Manual de la OIE sobre animales terrestres. (2008). Cap 2.4.3. Brucelosis Bovina.
- Manual diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. (2019). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_tecnicas_serologicas-2019-v4_brucelosis.pdf
- Morán, M.C., Bence, A., Sanchez Vallecillo, M.F., Lützelschwab, C., Rodriguez, M. Pardo, R, Goldbaum, F., Zylberman, V., Palma, S, Maletto, B. y Estein, S. (2021). Polymeric antigen BLSOmp31 formulated with class B CpG-ODN in a nanostructure (BLSOmp31/CpG-ODN/Coa-ASC16) administered by parenteral or mucosal routes confers protection against *Brucella ovis* in Balb/c mice.
- Nielsen, K.H. y Duncan, J.R. (eds.). (1990). Animal brucellosis. C.R.C. Press, Boca Ratón.
- Paolicchi, F. (2005). Epididimitis del carnero por *Brucella ovis* INTA Balcarce. <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Brucelosis%20Ovina%20-%20INTA.pdf>
- Paulin, L.M.S., Andrade-Pacheco, W.A., Castro, V. y Federsoni, I.S.P. (2009). Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. Arq.Inst.Biol.Sao Paulo, v.76,n1,p9-15.
- Saldarriaga, O. y Rugeles, M.T. (2002). Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para la estrategia vacunal. Rev.Col.Cienc.Pec. Vol 15:2,
- SENASA. Boletín Oficial, versión electrónica. Resolución 372-E/2017.Plan Nacional de Control de Brucelosis caprina. (<https://www.boletinoficial.gob.ar>).

CAPÍTULO 5

Vacuna contra carbunco

Alejandra Edith Larsen y Javier Barragán

Introducción

El carbunco, carbunclo bacteridiano, carbón, grano malo o ántrax, es una enfermedad zoonótica, infecto contagiosa que provoca una septicemia fatal. Tiene una presentación aguda o subaguda que afecta a todos los mamíferos, pero fundamentalmente a animales herbívoros, se presenta con carácter esporádico o causando epizootias con grandes pérdidas económicas.

El *Bacillus anthracis* es el agente etiológico de la enfermedad, es un microorganismo que presenta un estado de espora, su forma infectante de extraordinaria resistencia, responsables de sobrevivir por décadas en el medio ambiente y multiplicarse cuando las condiciones son adecuadas. El carbunco afecta animales domésticos así como también salvajes y exóticos. La especie humana es susceptible y el contagio se presenta a través de contactos con animales infectados, utensilios o productos animales contaminados. Se han descrito casos de contagios a través de la ingesta de alimentos cortados con cuchillos utilizados en necropsias, por monturas o aperos elaborados con cuero de animales enfermos y la forma más clásica, la enfermedad de los cardadores de lana.

Historia

Es una enfermedad cuyas crónicas se remontan a referencias que datan del año 3000 AC, aunque existe documentación fehaciente sobre la enfermedad en Europa entre los años 1491 y 1190 AC. El carbunco se encuentra descrito en el Viejo Testamento (Exodus 9:3) como dos de las diez plagas. El nombre ántrax (ἄνθραξ) viene de la palabra griega carbón, debido a las úlceras con centros oscuros que se desarrollan en la piel de las personas afectadas.

Hacia fines del siglo XV, John Bell describe la enfermedad en las personas cardadoras de lana y, en 1850, Casimir Davaines, médico francés, describe por primera vez el agente etiológico al observarlo en frotis de sangres de carneros infectados. Pero su papel destacado en el nacimiento de la microbiología clínica se debe a que, en 1876, Robert Koch lo aísla en estado puro, reproduce la enfermedad en animales de laboratorio de los cuales lo vuelve a aislar dando origen a los postulados de Koch. Una vez aislado y tipificado es nombrado como *Bacillus anthracis*. A

partir de este momento comenzó la investigación para el desarrollo de vacunas destinadas a prevenir la enfermedad.

Después del éxito de Pasteur por el desarrollo de una vacuna viva atenuada contra el cólera aviar, el concepto de atenuación inspiró a varios investigadores de la época.

La célebre experiencia se realizó en Pouilly-le-Fort, a las afueras de París, en mayo de 1881, donde Pasteur realiza una demostración pública de su vacuna contra el ántrax. El diseño experimental incluyó dos grupos de animales: el grupo vacunado, 24 ovejas, 1 cabra y 6 bovinos, recibieron dos dosis de la vacuna con un intervalo de 15 días; y el segundo grupo, que no fue vacunado. El 31 de mayo, treinta días después de la primera dosis, todos fueron desafiados con un cultivo vivo de carbunco. El 2 de junio, más de 200 observadores interesados acudieron a ver los resultados. Todos los animales del grupo no vacunados estaban muertos o moribundos, mientras que todos los animales vacunados sobrevivieron. Fue un gran evento mediático y un triunfo para Pasteur, que no solo se hizo famoso, sino que permitió comunicar a un gran público el extraordinario potencial de las vacunas para combatir las enfermedades infecciosas. Pasteur afirmó públicamente que había utilizado una vacuna viva atenuada. Sólo él y sus colegas sabían que había matado a las bacterias de la vacuna con bicromato de potasio. De todos modos, los medios de cultivo y las técnicas rudimentarias de la época quizás no permitieron detectar la presencia de microorganismos viables responsables de generar la respuesta contra las toxinas, única respuesta protectora contra el carbunco.

A partir de esta experiencia exitosa se produjeron una serie de modificaciones de la vacuna, siendo una de las más significativas la desarrollada por Max Sterne en 1937, veterinario y bacteriólogo italiano, logra empíricamente eliminar el plásmido pXO2 que codifica la capsula, desarrollando la vacuna anticarbuncosa que lleva su nombre a partir de una cepa atenuada acapsulada y acapasulógena de *Bacillus anthracis*, única vacuna autorizada por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad) en nuestro país.

Se han desarrollado además vacunas a toxoides, libres de gérmenes, adsorbidas en hidróxido de aluminio y vacunas recombinantes a base de antígeno protector (rPA).

Agente etiológico

El agente etiológico es el *Bacillus anthracis*. Perteneció al género *Bacillus* constituido por bacilos grandes Gram positivos, aerobio, con capacidad de esporular y presenta capsula. Miden aproximadamente 3 a 10 µm de largo y 1 a 1,5 µm de ancho. No son exigentes desde el punto de vista metabólico, desarrollando muy bien en medios comunes con una temperatura óptima de incubación de 37°C y con capacidad de desarrollar entre 25 y 37°C.

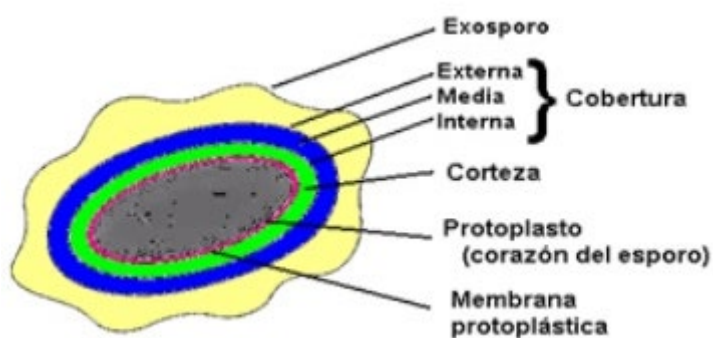
La esporulación comienza cuando las formas vegetativas se desarrollan en medios de cultivo envejecidos o en condiciones atmosféricas adversas. Los esporos poseen una larga sobrevivencia en el medio ambiente lo que facilita la prevalencia de la enfermedad.

La virulencia del *B. anthracis* está representada por sus factores de patogenicidad que le permiten sobrevivir en el medio ambiente y una vez ingresado en el individuo generar factores con alto potencial patógeno, responsable de las características agudas e hiperagudas de la enfermedad. Los factores de patogenicidad inespecíficos están representados por proteasas intra y extracelular (sideróforos, anthrolisina O, fosfolipasa C), pero sus principales factores de virulencia son la cápsula y las toxinas que produce, estos últimos son inmunógenos de interés para el desarrollo de vacunas.

Esporos

El espora es la forma de resistencia del bacilo en un medio ambiente hostil. Cuando la forma vegetativa se pone en contacto con el oxígeno del aire se produce la esporulación y de esta manera puede perdurar por décadas en el suelo. Tiene forma esférica u oval, no deforma el bacilo y mide aproximadamente 0,3 a 1 μm (Figura 5.1).

Figura 5.1. Corte de espora de *B. anthracis*.



Nota: Protoplasto, corazón del espora o core: esta estructura contiene el DNA y todos los elementos necesarios en forma deshidratada con capacidad de dar origen a la nueva célula. Corteza: conformada por finas láminas compuestas de peptidoglicanos, que le dan al espora mucha resistencia a diversos agentes injuriantes. Cobertura: es de estructura proteica con capacidad de tamizar y excluir el paso hacia la parte más profunda del espora de algunas enzimas y productos químicos. Exosporo: representa la estructura más externa del espora en forma de saco.

Está formado por varias capas, siendo la más externa el exosporo, seguida hacia el interior de una cobertura con tres capas o estamentos -externa, media e interna- luego la corteza, la membrana protoplástica y el protoplasto o corazón del espora.

Distintos estudios sugieren que los brotes están relacionados con suelos neutros o alcalinos, ricos en calcio y nitrógeno y con temperatura superior a 15,5 °C. Estos parámetros también impactan significativamente en la esporulación. El rendimiento de esporulación es típicamente más alto a la temperatura óptima de crecimiento, pH o a_w , y disminuye a medida que la temperatura, el pH o a_w se desvían del óptimo, alargando el proceso de esporulación. Actualmente aparecen casos en zonas endémicas que sufrieron algún cambio (inundaciones, sequías) que alteran el ecosistema, disminuyen la condición física de los animales, pero también generando condiciones

en el suelo que no solo favorecen la exposición a las esporas, sino también pueden beneficiar la multiplicación de la bacteria aumentando la carga de esporos en el ambiente y ser ingeridas por los animales susceptibles, sobre todo rumiantes. Por esto se la considera una enfermedad estacional, donde los casos de carbunco aumentan después de las épocas de lluvia.

Las esporas de ántrax son grumosas, concentradas y permanecen en aguas estancadas por su alta hidrofobicidad superficial, esto determina su mayor concentración en la superficie del suelo una vez que el agua se evapora. Esta relación entre el ántrax y el clima puede ayudar a predecir brotes y pensar protocolos adecuados de vacunación.

Cápsula

Es un factor importante en la patogenia de la enfermedad ya que impide la fagocitosis y protege al bacilo del reconocimiento por anticuerpos y de proteínas de fase aguda así como de la acción lítica del complemento debido a su carga aniónica en Ph fisiológico. La cápsula es considerada el principal factor de virulencia de *B. anthracis*, teniendo en cuenta su papel crucial en el establecimiento de la infección. La capsula del *B. anthracis* es peptídica y está constituida por un homopolímero lineal de D-glutamato anclada al péptidoglicano, con inmunogenicidad extremadamente débil, lo que le permite a la bacteria evadir la respuesta inmune y diseminarse en el hospedador. Comienza a sintetizarse inmediatamente después de la germinación, emerge como ampollas que van cubriendo al bacilo hasta que confluyen para quedar conformada como una capa continua encapsulando a la bacteria antes de emerger. Su función es proteger al bacilo dentro del fagolisosoma. La capsula esta codificada en el plásmido pXO2, la cepa Sterne es resultado de la perdida de este plásmido por lo que se la define como cepa acapsular y acapsulógena.

Toxina

La toxina producida por las formas vegetativas del *B. anthracis* provoca la muerte del individuo y la posterior liberación de los esporos al medio para reiniciar el ciclo. La existencia de las toxinas fue constatada por Smith y Keppie en el año 1954, al demostrar que el suero de cobayo infectado por *B. anthracis* esterilizado por filtración y por lo tanto libre de bacterias, era capaz de producir la muerte de un cobayo sano cuando se lo inoculaba por vía endovenosa.

Bacillus anthracis produce una única toxina de estructura proteica codificada por un plásmido termosensible denominado pXO1. Está constituida por tres factores antigénicamente diferentes, que actúan sinérgicamente y están codificados por genes plasmídicos distintos y denominados: 1-el antígeno protector, PA, (*protector antigen*) o FP (*factor protector*), 2-el factor edematógeno o FE o EF (*edema factor*) 3- el factor letal o FL o LF (*lethal factor*).

El PA que actúa como una translocasa, es el vehículo que permite el ingreso a las células del hospedador de los otros dos factores. Cada molécula de PA se une en forma aleatoria al FE o al

FL, constituyendo a través de esta unión la toxina edematógena y la toxina letal respectivamente. A un pH citoplasmático bajo, la FE genera un gradiente de AMPc responsable de destruir a las células. Entre otras acciones, causa edema extracelular al perder iones cloruro y agua de las células, afecta la actividad fagocítica de los neutrófilos y aumenta la motilidad de macrófagos infectados. El LF inactiva proteínasas citoplasmáticas, dando como resultado la apoptosis celular. También promueve la acción del factor de necrosis tumoral e interleucina-1 dentro de los macrófagos que conducen a la lisis celular y liberación de mediadores inflamatorios, lo que resulta en la apoptosis celular.

Los tres componentes de la toxina del ántrax son secretados en forma independiente y se encuentran libres en las fases líquidas de la sangre, en la linfa y también en los tejidos. La activación sólo se produce cuando la fracción PA se une a su receptor específico en la superficie celular.

Patogenia

El periodo de incubación del carbunco es difícil de determinar en una infección a campo, pero generalmente ocurre 3 a 7 días después de la infección por vía oral. En el ganado el periodo de incubación es de 1 a 14 días, o más. En los animales el curso clínico del ántrax puede ser sobreagudos, agudos, subagudos y crónicos. La forma sobreaguda se observa con mayor frecuencia en bovinos, ovinos y es la más común en caprinos, por lo que se los considera la especie centinela. Los casos agudos y subagudos también se describen en rumiantes, pero son más comunes en caballos. Si bien los perros y los gatos son menos susceptibles, pueden desarrollar formas crónicas, que es la más registrada en cerdos. Las aves son muy resistentes y las carroñeras pueden eliminar esporos por sus heces.

No obstante, todas las especies susceptibles presentan las tres vías clásicas de infección: inhalatoria, digestiva y cutánea, por abrasiones de la piel o mucosa. En humanos es una enfermedad profesional y un accidente posible es la autoinoculación de vacuna anticarbuncosa por mala praxis durante el proceso de vacunación de animales.

La fuente de infección son los fluidos de los animales muertos que contienen millones de formas vegetativas del bacilo que son volcados al medio ambiente. En contacto con el oxígeno, muchas de estas bacterias mueren, pero algunas se transforman en esporas que son sumamente resistentes y sobreviven en la lana o el pelo de los animales infectados y durante décadas en el suelo. La esporulación se completa a las 48 horas y la dosis mínima infectante para el ganado está estipulada en 5×10^8 esporas. Al ingresar en un animal por ingestión, inhalación o a través de heridas en la piel (esta última la puerta de entrada más común en el hombre), los esporos germinan en formas vegetativas que se multiplican en un gran número de bacterias. Una vez dentro de los macrófagos, son diseminadas hacia los órganos linfáticos secundarios locales y regionales donde continúan su multiplicación. Como resultado, un flujo continuo de bacterias sale por los vasos eferentes alcanzando el bazo y otros tejidos linfoides donde continúa multiplicándose.

Para su multiplicación la bacteria en división requiere la acción de las toxinas para evadir el sistema inmune del huésped y diseminarse en forma sistémica, normalmente a través de los ganglios linfáticos regionales asociados con el sitio de la infección. La falla del sistema inmune innato para contener la infección resulta en una bacteriemia masiva y toxemia, causando enfermedad aguda o hiperaguda que lleva a la muerte del animal con el consiguiente derramamiento de los bacilos al medio ambiente y así se completa el ciclo. Los mecanismos biológicos, físicos y químicos que desencadenan los diferentes signos y la muerte de animal infectado con el *B. anthracis* se describen en relación a los factores de patogenicidad y su interacción con el sistema inmune. Para su mayor comprensión y detalle se sugiere remitirse al capítulo de Carbunco del libro de cátedra Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria, volumen bacteriología.

Vacunas

Teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad, la casuística, mortalidad y especies afectadas -incluida la humana-, una vez aislado y clasificado el agente etiológico, los esfuerzos estuvieron dirigidos a la prevención y control de la enfermedad en el ganado a través de vacunas.

Las experiencias personales de Louis Pasteur, Robert Koch y otros microbiólogos contemporáneos, demostraron que la inoculación de bacilos atenuados protegía a los animales inoculados desafiados con la cepa patógena.

Las vacunas contra el carbunco de uso veterinario se pueden clasificar en dos tipos, según que plásmido de los 2 factores patogénicos específicos mantienen: las vacunas pXO1⁺/pXO2⁺, también clasificadas como vacunas tipo Pasteur, y las vacunas pXO1⁺/pXO2⁻ o cepa Sterne.

La vacuna de Pasteur se obtuvo luego de atenuarla por calor. La atenuación se logró mediante calentamiento de un cultivo de *B. anthracis* a una temperatura digenésica de 42-43°C. Según el grado de atenuación se obtuvieron 2 cepas vacunales Pasteur. La cepa Pasteur I fue el resultado de la atenuación a 42-43°C durante 15 a 20 días, y la cepa Pasteur II se atenuó a la misma temperatura, pero durante 10 o 12 días. La cepa Pasteur I era patógena para ratones y cobayos y la Pasteur II mucho más patógena, llegando a afectar conejos. Esta atenuación exitosa pero empírica, realizada por Pasteur, recién pudo ser comprendida en la década del '70, cuando Mikesell y colaboradores demostraron la característica de termosensible del plásmido pOX1 que codifica las toxinas y termoestable al plásmidos pOX2 que codifica la capsula.

Pasteur creyó erróneamente haber atenuado la cepa y en realidad en cultivo a temperatura digenésica algunas formas vegetativas perdían los plásmidos termosensibles pOX1 y por lo tanto la capacidad de producir toxinas. Los bacilos remanentes que lo conservaban son capaces de elaborar la toxina y por lo tanto la capacidad inductora de anticuerpos específicos.

Luego de esta experiencia exitosa, la vacuna elaborada por Pasteur adquirió una excelente reputación extendiéndose su uso a lo largo de todo el mundo, incluida la Argentina. Fue una vacuna que se aplicó exitosamente durante más de 50 años, pero si bien colaboró eficazmente

en el control de la enfermedad, con la masificación de su uso, comienzan a aparecer algunos inconvenientes. Eran vacunas de difícil estandarización y el mayor inconveniente era lograr lotes homogéneos en su grado de atenuación, lo que determinaba que la cepa Pasteur tuviera un grado de afección vacunal del 3% o más dependiendo de la susceptibilidad de la especie.

A lo largo del tiempo la vacuna sufrió una serie de modificaciones, pero siempre partiendo de la base de la elaborada por Pasteur. Algunas modificaciones no prosperaron, pero si otras como el agregado de glicerol y saponina para mejorar su formulación. De todos modos, los inconvenientes de atenuación, las fallas en los controles de eficacia y los eventos de afecciones vacunales no fueron resueltos.

Max Sterne logró desarrollar una vacuna a partir de una cepa de carbunco patógena aislada de bovinos a mediados de los años '30 del siglo pasado, en Sudáfrica.

La cepa patógena aislada fue cultivada durante 24 horas en un medio que contenía 50% de suero equino, en una atmósfera con un 30% de anhídrido carbónico. Sterne obtuvo una cepa rugosa acapsulada y acapsulógena, es decir sin cápsula y sin capacidad de producirla como consecuencia de haber perdido el plásmido responsable de la formación de la misma. Esta nueva cepa fue denominada 34 F2 y la vacuna elaborada a partir de la misma tuvo una amplia difusión en el campo veterinario.

La cepa Sterne perdió el plásmido pXO2 pero mantiene el pXO1, responsable de la formación de toxina. Esto determina que la cepa Sterne pueda ser fácilmente endocitada por los por células fagocíticas, aunque mantiene intacta la capacidad de producir toxina en forma similar a la cepa patógena, toxinas responsables de la inmunidad protectora de memoria.

En 1944, Sterne comunicó el éxito de su vacuna aplicada en gran escala en Sudáfrica. A partir de entonces, el uso de la vacuna avirulenta de Sterne de uso veterinario se ha extendido por todo el mundo, incluida la Argentina.

Producción de la vacuna Sterne

La vacuna anticarbuncosa Sterne o esporovacuna es una stock vacuna de producción por métodos convencionales.

Pasos de producción

Obtención de cepa

Las cepas vacunales se adquiere de centros de referencia. Se utilizan cualquiera de las cepas de *B. anthracis* 34 F2 o CN-3472. Las cepas deben conservarse liofilizadas para evitar que se disocien y pierdan su capacidad Inmunogénica.

Los controles de cepa son: pureza, conteo viable, disociación.

La conservación de cepa conlleva que cada laboratorio productor deba preparar un gran número de ampollas de cultivo liofilizado a partir del cultivo original y utilizar una ampolla en la producción de cada serie, que puede hacerse en medio sólido o líquido. Los medios de conservación son liofilización, congelación a -80 °C, en glicerina a -20 °C.

Elección del medio sólido y sistema de cultivo

Medio sólido: medio digesto triptico de caseína recomendado por Sterne o medio de Gladstone and Fildes. El sistema de cultivo para medios sólidos son botellas de Roux o Powinsky.

Medio líquido: medio digesto triptico de caseína recomendado por Sterne o medio de Gladstone and Fildes. El sistema de cultivo para medios líquidos son los fermentadores

Siembra e inoculación

Se abre una ampolla de cultivo liofilizado, se suspende el contenido con caldo extracto de levadura o caldo nutritivo y se siembran tubos o botellas de Roux. Después de 24 hs de incubación a 37°C, se resuspende el cultivo con caldo nutritivo o caldo extracto de levadura, se cosecha en un frasco distribuidor y se procede a sembrar las botellas de Roux con el mínimo de suspensión requerida para que cubra toda la superficie del medio, se deja 15 a 20 minutos en reposo para permitir la adherencia de las células al medio de cultivo.

Incubación

Las botellas se invierten y se incuban a 37°C durante 4 o 5 días.

Control precosecha. Al término de la incubación, se toma una muestra del cultivo de las botellas, y se realizan control de pureza, morfología, tinción para control de esporo (técnica de Wirtz-Conklin o de Moeller).

Recolección

Cuando se llega a una esporulación satisfactoria en el rango del 80-90% del cultivo, se procede a la recolección en un frasco de volumen adecuado para contener la suspensión de todas las botellas incubadas. Se resuspende el cultivo en solución fisiológica.

Glicerinización

Tienen como objetivo eliminar toda forma vegetativa del producto de recolección. Se agrega glicerina neutra al doble del volumen de recolección. Se incuba por 3 o 4 semanas a temperatura ambiente. Luego se mantiene a 4-6°C, esta suspensión glicerizada constituye la vacuna concentrada.

Estandarización

Se realiza conteo viable para determinar la concentración de la vacuna concentrada y definir cantidad de dosis logradas. Una vacuna concentrada de calidad varía entre 500 a 1000 millones de esporos por ml.

Formulación

La vacuna se diluye para su empleo en función del conteo viable anterior para conseguir una dilución en la cual haya una concentración final de 10×10^6 bacterias /ml. Como diluyente se utiliza una mezcla de partes iguales de glicerina y solución fisiológica buferada que contiene 0,05% de saponina.

Control de vacuna a granel. Una vez diluida a la concentración adecuada se realiza un conteo viable, control de pureza y disociación.

De la dilución 1/10.000 se siembran 2 placas de Petri con medio de Gladstone and Fildes.

Se incuban a 37°C durante 24 hs y se cuentan las colonias típicas.

Envasado

Con la vacuna a granel se procede al envasado y rotulación.

Control de Calidad

Externos e internos. Pureza, conteo viable y disociación.

Vacuna Sterne: generación de la respuesta inmune

La vacuna Sterne de uso veterinario es un inmunógeno a base de esporos, clasificada técnicamente como esporovacuna, que contiene, como mínimo, 10.000.000 de esporas por mililitro, suspendidas en partes iguales de solución salina bufferada y glicerina, adicionada de saponina como adyuvante.

Los anticuerpos antitóxicos son los principales responsables de la protección, teniendo en cuenta que estamos ante una enfermedad séptico-toxémica, siendo las toxinas liberadas la principal causa de muerte.

La principal función de los anticuerpos es neutralizar al factor PA evitando la unión de los factores edematógenos o letal para dar lugar a la toxina.

La inducción de la respuesta inmune está condicionada a la desesporulación del *B. anthracis* en el punto de inoculación. La saponina, que actúa como adyuvante, provoca un fenómeno inflamatorio local marcado, que determina una disminución de la tensión de oxígeno en el foco flogístico provocado por la inoculación. Precisamente aquí las esporas encuentran un medio adecuado de baja tensión de oxígeno para comenzar a desesporular y pasar a su forma vegetativa. Estas formas vegetativas serán acapsuladas, y acapsulógenas, por lo tanto, podrán ser fácilmente fagocitadas por las células endocíticas y así regular tiempo y cantidad de células con capacidad de producir toxina. Las toxinas así producidas comienzan con la inducción de los anticuerpos neutralizantes que van contrarrestando los efectos tóxicos de la misma. De esta manera, cuando la producción de toxina aumenta por el incremento de las formas vegetativas, el organismo posee la suficiente cantidad de anticuerpos para evitar la enfermedad. La vacuna no evita la infección, el *B. anthracis* patógeno de campo

infecta al animal, pero las toxinas producidas son neutralizadas por los anticuerpos vacunales, evitando la enfermedad. Se ha confirmado una alta correlación entre el nivel de anticuerpos neutralizantes anti-PA y protección. Más aun, se ha demostrado que la PA está asociada al esporo e *in vitro* se ha demostrado que anticuerpos anti-PA retrasan la germinación y facilitan la fagocitosis y lisis por parte de los macrófagos.

La cepa Sterne como quedó expresado anteriormente tiene la capacidad de producir toxina y por lo tanto es una vacuna potencialmente peligrosa. La dosis recomendada en vacunos y equinos es un mínimo de 20×10^6 esporas cultivables; en el caso de las ovejas, las cabras y los cerdos, es de 10×10^6 esporas cultivables. Los equinos pueden desarrollar la inmunidad de forma lenta tras la vacunación inicial; por lo tanto, algunos fabricantes recomiendan una vacunación inicial de dos dosis, administradas con 1 mes de diferencia, seguidas de una revacunación anual.

Las esporas de *B. anthracis* son estables en vacuna no liofilizada o liofilizada y no son necesarios conservantes. Se recomienda guardarla refrigerada (4°C).

Las cabras y llamas son muy sensibles y debe administrarse con precaución y como máximo una dosis de 1ml, asumiendo riesgos.

Los animales vacunados no deben destinarse al sacrificio para consumo humano antes de las 2 o 3 semanas posteriores a la inoculación.

En caso de inoculación accidental de la vacuna en la especie humana, se aconseja consultar al médico e iniciar tratamiento con antibióticos en forma temprana. En la mayoría de los casos no resulta patógena para el humano, pero individuos con inmunodeficiencias pueden presentar algún inconveniente.

La vacuna se aplica a partir de los 3 a 4 meses de edad. La inmunidad dura alrededor de un año, dependiendo de circunstancias individuales. La época ideal de vacunación es el comienzo de la primavera de manera que los animales estén inmunizados en el verano que es donde la enfermedad recrudece, si bien la aparición puede presentarse en cualquier época del año. En los campos malditos, es decir donde la aparición de casos es mayor, se aconseja dos vacunaciones al año. No es aconsejable vacunar hembras preñadas.

La vacuna tiene la capacidad de producir inflamación en el sitio de inoculación.

Está contraindicada la administración simultánea de antibióticos a animales vacunados, pues el antibiótico puede interferir con la vacuna. No se deben dar antibióticos durante algunos días antes y algunos días después de la vacunación.

La lucha contra el carbunco debe encararse de una manera integral, es decir a través de la vacunación, que es obligatoria, la correcta deposición y decontaminación de los cadáveres y el correcto manejo de los animales

Vacunas en la especie humana

Si bien la vacuna Sterne, dado su éxito en Medicina Veterinaria, se probó en humanos fue descartada por ser muy reactogénica y porque la capacidad de producción de toxinas que posee la hacen altamente riesgosa. Sin embargo, fue probada en la Unión Soviética.

Existen diferentes formulaciones de vacunas contra el ántrax para su uso en humanos en varios países. En Estados Unidos, existe una vacuna proteica contra el ántrax denominada AVA (anthrax vaccine adsorbed; BioThrax®), que como inmunógeno principal contiene PA, resultado de filtrados de cultivos microaerófilos de una cepa avirulento no encapsulada de *B. anthracis* libre de células. Como adyuvante se utiliza hidróxido de aluminio y más recientemente, se utiliza el compuesto oligodesoxinucleotídico como complemento adyuvante de AVA que ya ha sido autorizado para la profilaxis post-exposición, administrado por vía subcutánea. Algunos lotes contienen como impureza algo de FL y menor cantidad de FE. Esta vacuna estimula la inmunidad humoral, pero no la celular y se deben administrar 6 dosis a las semanas 0, 2 y 4, y a los 6, 12 y 18 meses.

En el Reino Unido, la vacuna contra el ántrax precipitado (AVP anthrax vaccine precipitated) es un alumbre precipitado de un filtrado de cultivo de la cepa *B. anthracis* Sterne (34F2) cuyo inmunógeno principal es PA (65%). Esta vacuna contiene trazas de FE (8%) y FL factor letal (3%) característica que potenciaría la respuesta inmune protectora. En Rusia se utiliza una vacuna viva atenuada contra el ántrax (LAAV, o LAV para abreviar) que, a diferencia de AVA y AVP, contiene esporas vivas de la cepa atenuada de *B. anthracis* STI. De manera similar, se ha desarrollado una vacuna viva atenuada de uso en China.

Las tres vacunas (AVA, AVP, LAV) inducen la producción de anticuerpos contra las proteínas del ántrax, pero con perfiles serológicos diferentes. En un estudio que comparó la producción de anticuerpos en humanos inducida por estas vacunas, se encontró que AVA y LAV inducen la producción sólo de anticuerpos anti-PA, mientras que AVP induce la producción de anticuerpos anti-PA, anti-LF y anti-EF. Los títulos de anti-PA fueron mayores en las vacunas AVA y LAV que en la vacuna AVP. Anticuerpos contra las esporas de ántrax también se detectaron después de la administración de LAV.

Aunque las vacunas para humanos actuales se consideran eficaces, presentan grandes desventajas como su importante reactogenicidad y sus inconvenientes en la definición de la composición, la variación entre lotes y sus protocolos de administración que incluyen varias dosis, han impulsado los esfuerzos para el desarrollo de vacunas de nueva generación. Las vacunas de nueva generación son cepas recombinantes capaces de secretar toxinas inactivadas, vacunas con PA recombinante, subunidades de PA y combinaciones quiméricas de LF-PA y EF-LF-PA, también se encuentran en etapas de desarrollo vacunas basadas en plásmidos.

Carbunco rural en la argentina

Entre los años 1590 y 1609 aparecen en las actas del Cabildo referencias a la aparición de la enfermedad en la República Argentina. En el año 1847, fue el médico y científico argentino, Francisco Javier Muñiz, quien describió el primer caso humano de la enfermedad.

El poeta José Hernández, autor del célebre libro Martín Fierro, en una publicación que data del año 1882, describe una enfermedad denominada “el grano, enfermedad conocida desde tiempos muy antiguos” y ya menciona la necesidad de no cuerear animales muertos súbitamente.

La primera remesa de vacuna anticarbuncosa que ingresa al país fue enviada por el propio Louis Pasteur en el año 1859, a raíz de la grave problemática que representaba la enfermedad. La primera constancia debidamente documentada del uso de la vacuna anticarbuncosa en la República Argentina data del año 1886 y fue aplicada en una estancia de la localidad de Gualeguay, provincia de Entre Ríos.

Durante décadas en la República Argentina fueron utilizadas en forma rutinaria las vacunas Pasteur, denominadas Pasteur I y Pasteur II. También fue utilizada una cepa denominada Chaco, probablemente de patogenidad intermedia entre las Pasteur I y II, de difícil caracterización, una cepa denominada Delphy 5 y la Cepa Sterne.

A través de la Resolución 705/81, SENASA establece las normas de elaboración, control y uso de la Cepa Sterne.

La Ley N° 6703/1961 y la Resolución 115/2014 establecen la obligatoriedad de la vacunación en la Provincia de Buenos Aires.

La Provincia de Santa Fe mediante la Resolución N° 1007/14 vigente, establece el Plan de Vacunación OBLIGATORIO contra Carbunco bacteridiano.

El Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires a través de la Resolución 115/2014 establece una serie de medidas que pueden consultarse en la página de la institución.

Referencias bibliográficas

- Abramova, F.A., Grimberg, L.M., Yampolskaya, O.V. y Walker, D.H. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlosk outbreak of 1979. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 90:2291-4.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, K.R. y Stiles, B.G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(3):373-402.
- Bail, O. (1904). Research into natural and artificial anthrax immunity. *German Zentralb, Bakteriolog. Parasitenk Infectionskr.* 47:270-2.
- Bail, O. (1915). Veränderung der Bakterien in Tierkörper. Ueber die Korrelation zwischen Kapselbildung, Sporenbildung und Infektiosität des Milzbrandbazillus. *Zentralbl Bakt Paras Infekt Krank. I. Orig.* 75:159-73.
- Bernagozzi, J.A., Barragán J.H. y Anselmino F. (2016). Carbunco. Pasado y presente. 16 *AnalectaVet.* 36 (2): - Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590
- Bernagozzi, J.A., Barragán J.H., Anselmino F. y Bernagozzi M.E. (2017) Carbunco. Prevención de la enfermedad Anthrax. Prevention of the disease, *Analecta Vet.* 37 (2):40-53 Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590 doi.org/10.24215/15142590e015
- Blaustein, O., Koehjer, T.M., Collier, R.J. y Finkelstein A. (1989). Anthrax toxin: Channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipoid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2209-13.
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J. y Young J.A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature.* 4:225-9.
- Cendrowski, S., MacArthur, W. y Hanna P. (2004). *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol.* 51:407-17.
- Chabot, D.J., Scorpio, A., Tobery, S.A., Little, S.F., Norris, S.L. y Friedlander, A.M. (2004). Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine* 23, 43-47.
- Coulson, N.M., Fulop, M. y Titball, R.W. (1994). *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. *Vaccine* 12, 1395-1401.
- Crane, B.R., Sudhamsu, J. y Patel, B.A. (2010). Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79:445-70.
- Davis, B., Dulbecco, R., Herman, N., Eisen, H. y Ginsberg, H. (1996). *Tratado de Microbiología.* 4a Ed. Barcelona. Salvat Editores.
- Elliot, J.L., Mogridge, J., Collier, y R.J. (2000). A quantitative study of the interaction of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry.* 39, 6706-13.
- Fouet, A. (2009). The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 30:374-85.
- Koch, R. (1876). Die aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur biologie der pflanzen.* 2:277-310

- Geison, G.L. (1995). The private science of Louis Pasteur. Princeton, NJ. Princeton University Press.
- Georgopoulos, A.P. y James, L.M. (2024). Anthrax Vaccines in the 21st Century. *Vaccines*. 12, 159. <https://doi.org/10.3390/vaccines12020159>
- Glomski, I.J. (2011). *Bacillus anthracis* dissemination through host. En: Bergman NH. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.12.
- Hanna, P. (1998). Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol*. 225, 13-35.
- Inglesby, T.V., O'Toole, T. y Henderson, D.A. (2002). For the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon: updated recommendations for management. *JAMA*. 287(17):2236-52.
- Ingram, R.J., Harris, A., Ascough, S., Metan, G., Doganay, M., Ballie, L., Williamson, E.D., Dyson, H., Robinson, J.H., Srisikandan, S. y Altmann, D.M. (2013). Exposure to anthrax toxin alters human leucocyte expression of anthrax toxin receptor 1. *Clin Exp Immunol*. 173:84–91.
- Ivins, B.E. (1998). Anthrax vaccines. How stable is the potency? Presented at the ASMth ifc, General Meeting. Atlanta, May 18.
- Liu, S. (2010). Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe*. 8, 455-62.
- Mazzucchi, M. (1931) The New Anti-Anthrax Vaccine Carbozoo. Its Composition and its Use in Practice. *Clin. Vet, Milano*. 54, 577-80
- Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristroph, J.D. y Dreier, T.M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun*. 39, 371-6.
- Moayeri, M., Leppla, S. (2004). The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Current opinion in Microbiology*. 7:19-24.
- Moayeri, M., Sastalla, I., Leppla, S.H. (2011). Anthrax and the inflammasome. *Microbes Inf*. 14:392-400.
- OIE. Manual de la OIE 2012. www.oie.int/es/
- Pasteur, L., Roux, E., Charbeland, C. (1880). Sur l'étiologie du charbon, *C.R.Acad Sci. (Paris)*, 91:86-94.
- Pavan, M.E., Pettinari, M.J., Cairó, F., Pavan, E. y Cataldi, A.A. (2011). *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología*. 43:294-310.
- Read, T.D., Peterson, S.N., Tourasse, N., Baillie, L.W., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R. (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*. 423, 81-86.
- Shlyakhov, E.N. y Rubinstein, E. (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine*. 12(8), 727-30.
- Smith, H. y Keppie, J. (1954). Observations on experimental anthrax: demonstration of specific lethal factor produced in vivo by *Bacillus anthracis*. *Nature*. 173, 869-70.
- Sterne, M. (1937). Avirulent anthrax vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind*. 7, 41-3.

- Tizard, I. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- Turnbull, P.C. (1991). Anthrax vaccine: past, present and future. *Vaccine*. 9(8),533-9.
- Zegers, N.D., Kluter, E., van Der Stap, H., van Dura, E., van Dalen, P., Shaw, M. y Baillie, L. (1999). Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J. Appl. Microbiol*, 87, 309-314.

CAPÍTULO 6

Campilobacteriosis genital bovina

Gabriel Eduardo Travería y Mauro Joaquín Manfredi

Introducción

Campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad infecto-contagiosa venérea, causada por especies del género *Campylobacter*, que se caracteriza por producir fallas reproductivas con importantes pérdidas económicas en los sistemas de producción ganadera.

Historia

En un principio, McFadyean denominó *Vibrio* al agente causal de abortos en lanares, por su forma espiralada. Más tarde Smith y Tylor denominaron *Vibrio fetus* a una bacteria aislada de un feto en condiciones de microaerofilia. En 1963, Sebald y Véron propusieron incluir a *Vibrio fetus* en el género *Campylobacter* para diferenciarla del género *Vibrio* por poseer características diferentes.

Agente etiológico

La campilobacteriosis genital bovina es producida por bacterias del género *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* (Cff), *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* (Cfv) y *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* biovar *intermedius* (Cfvi), las tres poseen características culturales y genéticas muy similares. Estas bacterias son bacilos cortos y finos, Gram -, con forma de S o espiralada, de aproximadamente 0.3-0.4 µm de ancho y 1.5-2.5 µm de largo. Son móviles gracias a un flagelo polar que presenta 3 a 4 ondulaciones, para su crecimiento *in vitro* requieren de una atmósfera en microaerofilia. Sus principales factores de patogenicidad se deben a antígenos somáticos o termoestables (O), flagelares (H) y cubriendo al antígeno O, se encuentra un antígeno inmunodominante, superficial y termolábil, denominado *surface-layer* (S-layer), compuesta por una serie de proteínas (SLPs) con alta capacidad de mutar y evadir la respuesta inmune.

Transmisión

Campylobacter fetus subespecie *fetus* puede colonizar el tracto digestivo de diversos hospedadores, incluidos los bovinos sanos, y llegar al útero grávido por el torrente circulatorio, debido a que la bacteria puede atravesar la mucosa intestinal. La transmisión de *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*, se produce por vía sexual durante la monta natural, solo se encuentra en el aparato reproductor de los bovinos, también puede transmitirse a través de la inseminación artificial, con semen de toros infectados, debido a que la bacteria no pierde viabilidad con la congelación. En el macho infectado, la bacteria se encuentra esencialmente en la luz de las criptas del epitelio prepucial, principalmente en la zona del fómix, pero sin penetrar, ni dañar los tejidos. La concentración bacteriana puede variar entre 2×10^2 y 2×10^4 de bacterias/mL en la secreción prepucial, variando de acuerdo a la actividad sexual. La concentración bacteriana en la secreción prepucial, influencia la capacidad de difusión, los machos jóvenes son menos susceptibles a la enfermedad, con el tiempo, las criptas prepuciales se van haciendo más profundas, generando condiciones adecuadas para el desarrollo bacteriano, transformándose en portadores permanentes con la edad, sin afectar la calidad seminal ni la libido.

Patogenia y signología

Las infecciones venéreas causadas por el género *Campylobacter* muestran un tropismo acentuado por el aparato genital del ganado bovino, tanto masculino como femenino. En el macho no genera signos clínicos, como única alteración, se encuentra ocasionalmente una infiltración de mononucleares en la lámina propia. Las hembras pueden presentar una patología variable que depende de la experiencia inmune, la capacidad de transmisión del macho y la cepa infectante. Las infecciones con *Cfv* se asocian a fallas reproductivas desde el 1^{er} al 4^{to} mes de gestación caracterizadas por: fallas en la concepción, repetición de servicios con celos irregulares, fallas en la implantación del embrión, mortalidad embrionaria y abortos. Las infecciones con *Cff*, se asocian a fallas reproductivas desde 5^{to} al 9^{no} mes de gestación. Una vez que el microorganismo es introducido en la vagina durante la fase ovulatoria, coloniza el cuello uterino en el 5^{to} día y el cuerno uterino los días 12 - 14. En estas localizaciones comienza una respuesta inflamatoria celular con aumento de linfocitos, neutrófilos y plasmocitos. La presencia bacteriana en el útero, es acompañada por modificaciones en la estructura del endometrio, iniciándose en la capa más superficial y avanzando hacia los estratos más profundos, con infiltración difusa de leucocitos y tejido conectivo. La bacteria coloniza las glándulas uterinas afectando su actividad secretora y produciendo un exudado blanco-grisáceo que cubre la luz glandular, compuesto por leucocitos principalmente y células epiteliales necróticas. Con la respuesta inflamatoria hay una disminución de la tensión parcial de oxígeno, dificultando la implantación y supervivencia del embrión en desarrollo. Hacia el día 20 hay una modificación en la estructura del endometrio, con estos cam-

bios se deja un ambiente poco viable para el embrión, haciéndose presente una mortalidad embrionaria, con repetición de celo e infertilidad que será recuperable en 3-6 meses, tiempo necesario para que el proceso inmunitario controle la bacteria y regenere el endometrio. En la infección natural, los anticuerpos de la mucosa genital, aparecen a los 14-30 días pos infección en coincidencia con las lesiones en los tejidos, generados por la presencia de las células plasmáticas en las mucosas y por el exudado inflamatorio. Secuencialmente, las primeras inmunoglobulinas en aparecer en la infección natural son las IgM, pero decrecen rápidamente. A continuación aparecen las IgA, a su vez son las que presentan la mayor permanencia, poseen actividad neutralizante, pero carecen de actividad opsonizante. Finalmente aparecen las IgG con capacidad neutralizante y opsonizante, permanecen más tiempo que las IgM, pero menos que las IgA. El patrón de aparición de las inmunoglobulinas se puede resumir de la siguiente manera: IgM-IgA-IgG, y la desaparición sería: IgM-IgG-IgA. La presencia de IgG es importante porque además de ser neutralizante, por su actividad opsónica favorece la fagocitosis y por ende la eliminación bacteriana. La IgA con su función neutralizante, impide que las bacterias colonicen nuevamente los tejidos en los animales carriers, pero por carecer de función opsonizante, no garantiza la fagocitosis bacteriana y por lo tanto su eliminación. El antígeno termolábil S-Layer es uno de los factores de virulencia de mayor importancia, por su capacidad de interferir con la respuesta inmunitaria. Un mecanismo de evasión consiste en inhibir la vía alterna de activación del complemento, evitando la unión del factor C3b a la superficie de las bacterias que poseen S-layer. La otra forma es mutar las proteínas SLPs que componen S-layer, cuando son reconocidas por los anticuerpos, evitando la opsonización y la activación de la vía clásica del complemento. Estas nuevas variantes antigénicas son responsables de permitir la persistencia en el tracto reproductor, transformando a sus huéspedes en portadores o carriers (mucus cérvico vaginal, secreción uterina).

Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico consisten en buscar el agente causal en los fetos abortados, en las hembras con problemas reproductivos y en las muestras de esmegma prepucial de los toros. La presencia de la bacteria se puede evidenciar por marchas bacteriológicas o inmunofluorescencia directa. Por tratarse de una infección en mucosas, el diagnóstico serológico con suero no es relevante.

Prevención y tratamiento

El manejo de la enfermedad incluye medidas de manejo y prevención combinadas con el diagnóstico, la indicación de vacunar dependerá de la situación epidemiológica de acuerdo al criterio del veterinario actuante. Las vacunas utilizadas son inmunógenos inactivos, bacterinas con adyuvantes de hidróxido de aluminio u oleosos. En el mercado existen diversas

formulaciones, pueden estar combinadas con otros agentes infecciosos, se recomienda 40 mg de peso seco por dosis. La mayoría de los laboratorios productores recomiendan la aplicación subcutánea o intramuscular de dos dosis, en hembras y machos, separadas por 20-30 días, 60 y 30 días previo al servicio, en la primovacunación. En los animales que ya iniciaron el plan de vacunación, repetir anualmente, 30 días previos al servicio. El plan de vacunación sistémica pretende lograr la mayor titulación posible de anticuerpos IgG circulantes durante el estro, para que los anticuerpos IgG presentes en la circulación sanguínea tengan una mayor posibilidad de ser trasudados al endometrio y evitar las pérdidas reproductivas. En los casos que así lo ameriten, se puede indicar el tratamiento con antibióticos como la dihidroestreptomicina, estreptomicina y la oxitetraciclina.

Referencias bibliográficas

- Bondurant, R.H. (1999). Inflammation in the bovine female reproductive tract. *Journal of Animal Science*, 77(2), 101.
- Cobo, E.R., Morsella, C., Cano, D., Cipolla, A. y Campero, C.M. (2004) Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology*;62(8):1367-82.
- Corbeil, L.B., Duncan, J.R., Schurig, G.G., Hall, C.E. y Winter, A.J. (1974) Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect Immun*. 1974 Nov;10(5):1084-90.
- Stanchi, N.O. (2019). Microbiología Veterinaria, Ed Intermédica. ISBN: N° 978-950-555-574-4

CAPÍTULO 7

Vacunas contra enfermedades clostridiales

Mauro Joaquin Manfredi y Javier Barragán

Introducción

Las enfermedades clostridiales de los bovinos y ovinos son toxi-infecciones causadas por bacterias anaerobias del género *Clostridium*. Las manifestaciones clínicas que desarrollan los animales pueden variar de acuerdo a la especie afectada como así también a la categoría involucrada, las toxinas producidas por el agente causal pueden generar desde trastornos digestivos y neuromusculares, parálisis, gangrena incluso muerte repentina. La forma más efectiva de prevenir su aparición es principalmente la vacunación de los rodeos en las zonas endémicas y la implementación de las medidas de prevención en las situaciones que puedan favorecerlas.

Historia

Los bacilos anaerobios comenzaron a ser investigados por Louis Pasteur en 1877 cuando describió por primera vez a *Clostridium septicum* (en ese momento denominado “vibrión septique”). En 1894 describió el *Bacillus oedematiens* por Novyi (*Clostridium novyi oedematiens*). *Clostridium perfringens* fue descrito por Welch y Nuttal en 1892 identificado como *Bacillus aerogenes capsulatus* y también como *Clostridium welchii* en Gran Bretaña. Fueron causantes de gangrena, parálisis y mionecrosis graves en medicina humana durante la 1era Guerra Mundial, que llevaban a la amputación de miembros en personas afectadas. Si bien no hay desarrollo de vacunas contra clostridios en medicina humana, sí se han producido sueros antitoxinas.

Agentes etiológicos

El género *Clostridium* es un grupo diverso de bacterias anaerobias estrictas gram positivas con forma de bacilo o bastón. En su mayoría no poseen cápsula (a excepción de *C. perfringens*, que posee cápsula y es inmóvil) y forman esporas resistentes al calor y a otros factores ambientales cuando las condiciones son desfavorables. Su principal hábitat es el suelo y el tracto intestinal de mamíferos. En su forma vegetativa poseen diversos factores de patogenicidad que forman parte de la estructura del agente, como por ejemplo fimbrias que le otorgan adherencia;

flagelos, para su movilidad; cápsula que les permite evadir la fagocitosis, todos ellos con actividad inmunogénica. Muchas especies son capaces de producir potentes toxinas, clasificadas en toxinas mayores, preponderantes en la patogenia y generalmente letales y toxinas menores, secundarias o complementarias, siendo en general no letales *per se*, pero sí todas con capacidad inmunogénica.

Entre los más frecuentes, en medicina veterinaria se destacan: *C. chauvoei*; *C. septicum*; *C. sordellii*, *C. novyi*; *C. perfringens*; *C. botulinum*; y *C. tetani*. Dentro de las infecciones clostridiales se pueden clasificar: gangrenas gaseosas (generan mionecrosis y toxemia), enterotoxemias (afectan al tracto gastrointestinal y órganos parenquimatosos); e intoxicaciones neurotrópicas (afectan principalmente al sistema nervioso)

A continuación, se presentan las principales características de las enfermedades causadas por bacterias del género *Clostridium*:

Mancha (Gangrena enfisematosa, miositis necrótica)

Es una infección endógena, zoonótica, no contagiosa, causada por toxinas de *C. chauvoei*. Puede afectar a animales jóvenes de 3 meses a 2 años, ubicados en zonas de inundaciones con posteriores sequías que generan condiciones para la supervivencia de las bacterias. Los esporos son ingeridos con la pastura, heno o silaje e ingresan al torrente sanguíneo por lesiones en la boca, como cambio de dientes o algún traumatismo en los pre-estómagos y se localizan en músculos esquelético o cardíaco a la espera de las condiciones adecuadas para pasar a su forma vegetativa capaz de producir toxinas y gas. Se caracteriza por ser de curso hiperagudo, y producen necrosis y lisis tisular con signología locomotora, coma y muerte. El tratamiento se basa en antimicrobianos, sueros hiperinmunes e inmunoprofilaxis.

Enterotoxemia

Es una enfermedad endógena entérica y generalizada producida por toxinas de *C. perfringens* tipos B, C y D; *C. novyi* tipos B y D y más raramente por *C. sordelli* y *C. septicum*. El desarrollo de la enfermedad suele estar condicionado por cambios bruscos en la dieta de carbohidratos fermentables como granos; cargas altas de parásitos con daño de la mucosa intestinal; sobredosificación de fármacos y heridas traumáticas e inmunosupresión que favorezcan la multiplicación bacteriana y su producción de toxinas. Una vez que ingresan las toxinas al torrente sanguíneo causan la muerte rápida del animal con presentaciones de signos nerviosos principalmente, y signos gastrointestinales, renales y cardiopulmonares en menor medida. La prevención debe ser por medio de la inmunoprofilaxis y antimicrobianos para controlar la proliferación bacteriana y la producción de toxinas.

Edema maligno (gangrena traumática)

Es una infección exógena esporádica causada por la contaminación de heridas perforantes profundas con *C. septicum*, *C. sordelli*, *C. novyi* o *C. perfringens* tipo A de forma iatrogénica por intervenciones quirúrgicas, o fracturas expuestas. En la zona afectada se dan las condiciones para que los esporos pasen a forma vegetativa produciendo toxinas, abundante exudado y gas, dañando el tejido muscular, provocando postración, hinchazón de miembros, anorexia, sepsis y muerte. Puede presentarse de forma aguda o crónica y se debe prevenir mediante vacunación.

Hemoglobinuria bacilar

Es una enfermedad enzoótica causada por *C. haemolyticum* (*C. novyi* tipo D), productores de toxinas altamente hemolizante, necrotizante y letal. Es de curso agudo y mortal, caracterizada por presentar fiebre alta, decaimiento, ictericia, hemoglobinuria y muerte. El agente se desarrolla en condiciones predisponentes como una necrosis tisular por *Fasciola hepatica*, necrobacilosis, telangiectasia, alimentación rica en nitratos o biopsia hepática, genera grandes volúmenes de toxinas con formación de trombos en la vena porta, infarto local y toxemia, con hemólisis intravascular y bacteriemia. Algunos animales pueden desarrollar la infección en forma subclínica y quedar inmunes actuando como diseminadores. Pueden realizarse tratamientos con antimicrobianos y prevenir mediante vacunación.

Botulismo (Mal Aguapey)

Es una infección mortal producida por la exotoxina de *C. botulinum* tipo C o D, en general con presentación enzoótica por comportamientos de osteofagia en animales. *C. botulinum* se desarrolla en pH neutro, por lo que se distribuye en el suelo, vegetales y animales en descomposición. Su toxina es una neurotóxica protoplásmica (localizada en citoplasma y liberada por lisis celular) que se une a receptores del sistema nervioso a nivel de la unión pre-sináptica neuromuscular periférica, alterando la función de los músculos estriados por inhibición de la liberación de acetilcolina resultando en parálisis flácida (pérdida tonicidad muscular). El único control de la enfermedad se da por buenas prácticas y manipulación de alimentos y medidas de inmunoprofilaxis.

Tetano (mal quijada)

Es una enfermedad exógena de mayor importancia en ovinos y caprinos asociadas a heridas maniobras de descole, castración y esquila y posterior contaminación con *C. tetani*, productor

de potentes toxinas (tetanospasmina y tetanolisina), aunque también puede ingerir microorganismos y toxinas por vía oral. Una vez ingresada al torrente sanguíneo, la tetanospasmina afecta el sistema nervioso y se une de forma irreversible a las membranas sinápticas e impide la exportación de neurotransmisores de la sinapsis. Causa principalmente hiperexcitabilidad de las neuronas motoras con contractura generalizada, parálisis espástica al inhibirse el circuito nervioso espinal que asegura un adecuado equilibrio de la contracción de músculos opuestos, temblores, opistódomos y muerte por afección de los músculos respiratorios. El tratamiento consiste en administrar suero antitetánico y antibioticoterapia para evitar la multiplicación del microorganismo en el sitio de ingreso y la prevención mediante vacunación.

Vacunas clostridiales

Las vacunas contra enfermedades clostridiales se elaboran con la finalidad de inducir respuestas inmunes mediadas por anticuerpos, y de acuerdo al sustrato inmunizante específico pueden producirse vacunas a toxoides o anatoxinas (compuestas exclusivamente por toxinas, generalmente mayores, detoxificadas) y anacultivos que contienen el cultivo completo, somas bacterianos y toxinas inactivadas.

La formulación de las vacunas combinadas o multivalentes debe asegurar que cada valencia o cada componente induzca un nivel mínimo de protección requerido para cada tipo clostridial por separado o en forma individual determinado por pruebas de potencia o eficacia.

Elaboración de la vacuna

Las vacunas elaboradas son anavacunas, es decir que contienen el microorganismo completo inactivado y sus productos metabólicos (toxinas inactivadas o toxoides), las cepas empleadas provienen de organismos de referencia nacionales como el SENASA, INTA o internacionales como el ATCC y pueden conservarse, dado que algunas poseen inestabilidad antigénica y pierden sus factores de virulencia más importante, por medio de liofilización, repiques en medios de cultivos específicos: Tarozzi, Hibbler, tioglicolato, etc., o congelamiento a -70°C con crioprotectores como glicerina o DMSO.

Será necesario comenzar a trabajar en aumentar el volumen de esos cultivos para poder producir los diferentes principios activos a escala industrial, en biorreactores o botellas o recipientes estáticos, siempre priorizando la calidad final del producto.

En su proceso de escalado (*scaling up*) se realizan cultivos en tanques con una mezcla de gases para anaerobios constituida por 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de hidrógeno a una temperatura óptima de $34 - 37^{\circ}\text{C}$, siendo variable el tiempo dependiendo el clostridio a cultivar. Transcurrido el tiempo de incubación se realizan controles de pureza (coloración de gram y siembra en cultivo), identidad (inoculación en ratones) y seguridad.

Luego se transfiere a otro tanque para su posterior inactivación o detoxificación con un método mixto que combina un elemento químico (formol) y un elemento físico (temperatura). Este proceso tiene como objetivo matar las formas vegetativas e inactivar toxinas y es un paso fundamental ya que es una gran desventaja en caso de que no se logre una correcta inactivación por el proceso de fermentación bacteriana que cubre el cultivo de gas excesivo.

La transferencia de cultivos dependerá de la especie clostridial y el inmunógeno que quiera purificarse, en caso de ser toxoides se hará la separación de microorganismos y esporos de sus metabolitos tóxicos por centrifugación y se transferirán a un tanque estéril para su posterior inactivación.

Una vez realizada la inactivación de los inmunógenos que conforman la vacuna se almacenan en cámaras hasta finalizar los respectivos controles y concentración de la masa antigénica. Es de gran importancia la inactivación de algunas especies de clostridios como el soma *C. chauvoei* ya que la respuesta se encuentra asociada a la pared celular y la vacuna se utiliza esporos y no presenta flagelos ni factores de virulencia, y asociados a proteínas o toxinas como *C. perfringens* tipo C y D, somas y toxinas de *C. septicum*.

Los controles de calidad para las vacunas clostridiales se describen como control de inactivación, clave para su uso y aprobación por organismos oficiales, por métodos *in vitro* e *in vivo*; controles de pureza e identidad, inocuidad, esterilidad e integridad celular y potencia una vez el producto finalizado.

Si bien los candidatos vacunales para dicha vacuna no requieren adyuvantes, se formulan con hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, o adyuvantes oleosos, o una combinación entre sales de aluminio y potasio (alumbres). Estos adyuvantes tienen una desventaja que forman una película alrededor del toxoide y reducen drásticamente el pH a 3, pudiendo alterar algunas estructuras antigénicas.

En su fase de producción hay que hacer hincapié en la formulación ya que son vacunas polivalentes, con muchos microorganismo y metabolitos tóxicos actuando como inmunógenos esenciales para cubrir un espectro amplio de prevención de enfermedades. El producto finalizado posee una dosis de 5 ml sumado a los adyuvantes (~ 2 ml) como se muestra en la tabla 7.1, obteniendo así un producto con una dosis de 6 o 7 ml, inviable para la aplicación.

Tabla 7.1. Formulación de vacunas convencionales contra clostridios

Inmunógeno	Fórmula	Título	Cantidad/dosis
<i>C. chauvoei</i>	1.5 x 10 ⁹	1,5 x10 ⁹	1 ml
<i>C. Perfringens C</i>	3200 DL 50%	1600 DL 50%	2 ml
<i>C. septicum</i>	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	1 ml
<i>C. Perfringens D</i>	5000 DL 50%	2500 DL 50%	2 ml

En la actualidad comenzaron a fabricarse y expedirse formulaciones de 2 ml por dosis vacunal, obtenida a partir de una concentración antigénica por métodos de filtración tangencial (UFT) en una concentración de 10X, como se observa en la tabla 7.2. En estos casos se agrega ~ de 1 ml de adyuvante y se completa la formulación con solución fisiológica volumen final, obteniendo una vacuna que cumpla con los estándares accesibles para su aplicación.

Tabla 7.2. Formulación de vacunas luego de método UFT

Inmunógeno	Fórmula	Título	Concentración	Cantidad/dosis
<i>C. chauvoei</i>	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$	0,1 ml
<i>C. perfringens C</i>	3200 DL 50%	1600 DL 50%	16000 DL 50%	0,2 ml
<i>C. septicum</i>	1×10^9	1×10^9	1×10^{10}	0,1 ml
<i>C. perfringens D</i>	5000 DL 50%	2500 DL 50%	25000 DL 50%	0,2 ml

Respuesta inmune

La respuesta inmune protectora contra clostridios es predominantemente humoral sistémica con producción de IgG frente a una variedad de inmunógenos como la cápsula, soma, flagelos, toxinas mayores y menores. Los anticuerpos producidos ante la infección o vacunación son capaces de neutralizar toxinas bloqueando la fijación a las células o receptores (*C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*) y en el caso de anti-somáticos o anti-flagelares bloqueando la movilidad, adherencia y opsonización facilitando la fagocitosis (*C. chauvoei*) y ambos mecanismos para *C. septicum*, *C. novyi* y *C. sordelli*. Si se aplica una única dosis los anticuerpos empiezan a decaer a partir de las 7 semanas post-inoculación por lo que es esencial la aplicación de dos dosis ya que los anticuerpos alcanzan niveles elevados recién 15 días después de esta y empiezan a descender al año brindando protección por un tiempo más prolongado que con una única dosis.

Planes de vacunación

El veterinario es quien debe tomar la decisión de cuándo vacunar, con que vacuna y cuales animales. Sin embargo, la bibliografía y laboratorios productores sugieren el siguiente calendario:

Bovinos

- Primo vacunados: las categorías de terneros deben recibir dos dosis con un intervalo de 4-6 semanas a partir de los 3 meses de edad y una revacunación anual, en lo posible antes de los 2 años ya que luego se observa resistencia natural sin problemáticas en la presentación de enfermedades clostridiales. En animales adultos se mantiene el protocolo

de terneros, en caso de ser animales no vacunados y en las hembras gestantes se aplican dos dosis a los 60 y 30 días pre-parto para asegurar una buena transferencia de anticuerpos al neonato y protección de la madre al parto.

- Animales con antecedentes de vacunación: Adultos: Una dosis anual y en hembras gestantes 30 días pre-parto.

En zonas con mayor riesgo pueden realizarse revacunaciones al inicio del verano, otoño y primavera.

Ovinos y caprinos

- Primo vacunados: primera dosis a los 3 meses de vida con la señalada y una segunda dosis 3-6 semanas después de la primera, luego se sugiere revacunar 30 días pre-parto para asegurar una buena transferencia de anticuerpos por el calostro a los corderos. En los establecimientos con serios problemas se recomienda una tercera dosis a los 5 meses de la segunda.

Cuando se realizan reposiciones de animales lo más recomendable es considerarlos como no vacunados y realizar un plan sanitario completo previo a su incorporación al rodeo o majada.

En todos los casos es importante controlar la presencia de factores condicionantes, realizando desparasitaciones regulares en las zonas de riesgo, implementando correctas medidas de manejo durante la esquila, descole, etc. y la aplicación de medicamentos con materiales en buenas condiciones de higiene, conservación y esterilidad, como así también evitar los cambios dietéticos bruscos.

En los casos de brotes es conveniente vacunar a todos los animales en situación de riesgo y administrar los antibióticos adecuados a los que presenten signos compatibles, aunque esto no garantiza buenos resultados.

Referencias bibliográficas

- Campero, C.M. (2010). Vacunación en bovinos (Parte 1 y Parte 2). Visión Rural, 1 (81): 26-29. Patología Veterinaria, INTA EEA Balcarce.
- Hageman, J. (1991). Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 10 (3), 749-764.
- Walter Ledermann D.(2003). Historia del *Clostridium botulinum* . Rev chil infect. 39-41.
- Morris, W.E., Fernández-Miyakawa, M.E. (2009). Artículo especial. Toxinas de *Clostridium perfringens*. Revista Argentina de Microbiología, 41: 251-260.
- OIE. (2010). Terrestrial Manual. Los bancos de vacunas (capítulo 1.1.10).
- OIE. (2008). Pruebas para comprobar la esterilidad y la ausencia de contaminación de los Productos biológicos (capítulo 1.19)..
- OIE. (2015) Principios de producción de vacunas veterinarias (capítulo 1.1.8)..
- Robles, C.A. (1998). Enfermedades Clostridiales del Ganado. Clostridial diseases of livestock. Epidemiología. 1^{ra} edición. Argentina. ISBN Nº 950-43-9347.
- Robles, Carlos. 2008. Cómo prevenir las enfermedades clostridiales en ovinos y caprinos en la patagonia. Sitio Argentino de Producción Animal. Presencia, Nº 52, pág. 34-39.
- Steinman, A., Chaffer, M., Elad, D., y Shpigel, N. Y. (2006). Quantitative Analysis of Levels of Serum Immunoglobulin G against Botulinum Neurotoxin Type D and Association with Protection in Natural Outbreaks of Cattle Botulism A. Clinical and vaccine immunology, 13: 8, 862–868.

CAPÍTULO 8

Vacuna contra la leptospirosis

Paula Lorena Martín y Ariel Koval

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis extendida mundialmente causada por bacterias del género *Leptospira*, que afecta a numerosas especies de animales. Desde su descripción en 1886, ha permanecido endémica o causando brotes en muchos países con impacto tanto en salud pública como en la producción ganadera. La Organización Mundial de la Salud (WHO), denuncia que cada año ocurren aproximadamente 59.000 muertes en seres humanos de un millón de casos infectados en todo el mundo. Por otra parte, en lo que respecta a la producción ganadera, la infección provoca muertes en animales jóvenes y desórdenes reproductivos (abortos, infertilidad) en los rodeos afectados resultando en un impacto económico negativo.

Numerosas especies de animales domésticos y silvestres pueden contraer la infección. Los caninos y roedores son considerados los principales reservorios en áreas urbanas, mientras que los rumiantes y cerdos constituyen importantes hospedadores en áreas rurales y suburbanas. En estos, la bacteria se aloja principalmente en los túbulos renales por lo cual, la orina representa la principal fuente de contaminación para el ambiente y de infección para otras especies y para los seres humanos.

La transmisión de la infección ocurre por contacto directo con fluidos biológicos de animales infectados o indirectamente a través de suelos o aguas contaminadas. En este contexto, los seres humanos pueden contraer la enfermedad al realizar actividades laborales como los médicos veterinarios, tamberos o empleados de frigorífico, por lo cual se la define como enfermedad profesional. Las personas también tienen riesgo de contraer leptospirosis durante actividades recreativas como natación, canotaje o pesca en aguas con poca corriente. Asimismo, la ocurrencia de desastres naturales como fuertes lluvias e inundaciones contribuyen al aumento de casos.

Desde la perspectiva de Una Salud la vigilancia de la leptospirosis es importante tanto para la salud animal como para la salud pública. Además, constituye una enfermedad de notificación obligatoria por Ley N° 15.465 -Régimen Legal de las Enfermedades de Notificación Obligatoria y Resolución 422/2003 del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Aunque no esté enmarcada en un plan nacional de control y erradicación, la principal estrategia para su control en animales es la vacunación. Además, esta medida constituye una herramienta probada para disminuir el riesgo de transmisión al humano que trabaja en estrecho contacto con los animales.

Agente etiológico

El género *Leptospira* pertenece al orden Spirochaetales y a la familia Leptospiraceae. Dentro de este género se reconocían dos especies, *L. interrogans*, que agrupaba las cepas patógenas y *L. biflexa*, que incluía las cepas de vida libre aisladas del medio ambiente. A su vez, según la clasificación serológica, cada una de estas especies se encuentra dividida en serovares, según las diferencias antigénicas de los carbohidratos que componen el lipopolisacárido. Los serovares que comparten antígenos en común son agrupados en serogrupos. Hasta el momento se han descrito más de 250 serovares para *L. interrogans* distribuidos en 24 serogrupos y unos 60 serovares para *L. biflexa*. Actualmente, a través de técnicas moleculares y estudios filogenéticos, se han logrado identificar 68 especies agrupadas en 2 subclados patógenos (P1 y P2) y 2 saprófitos (S1 y S2).

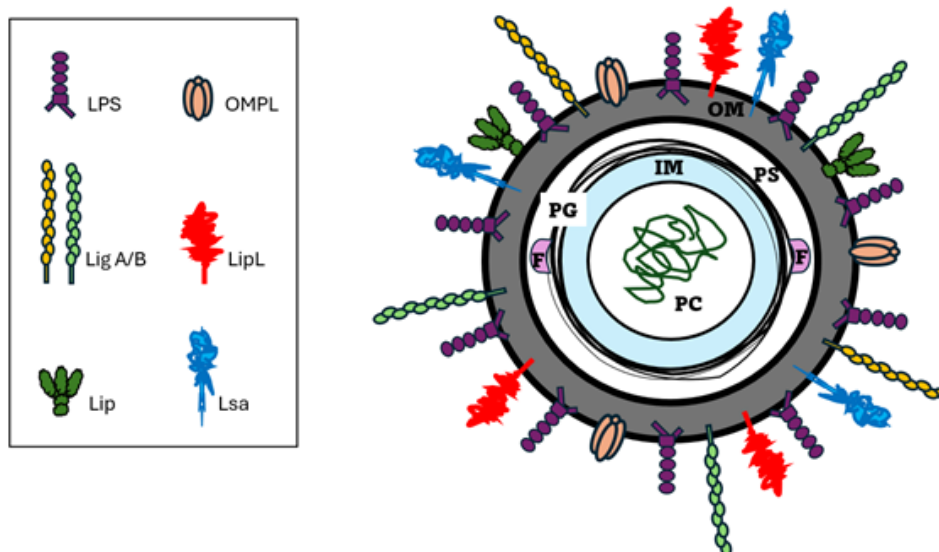
Como su nombre lo indica, son bacterias delgadas con forma de espiral y uno o ambos extremos curvados o en forma de gancho. Miden aproximadamente 0,1 μm de diámetro por 6 a 20 μm de longitud. Estructuralmente, las leptospiras poseen una envoltura celular similar a las bacterias gramnegativas con una membrana interna o citoplasmática, una pared celular compuesta por una fina capa de peptidoglicano y una membrana externa compleja en la que se anclan diferentes biomoléculas que participan activamente en la patogenia de la enfermedad y algunas de ellas constituyen elementos con carácter antigénico. Además, presentan un cilindro protoplásmático que contiene el nucleóide y dos flagelos periplásmicos, situados entre la membrana externa y la pared celular, fijos en ambos polos, con sus extremos libres extendidos hacia la parte media, pero sin superponerse, responsables del movimiento activo de rotación y traslación (Figura 1).

En relación con los constituyentes de la membrana externa existen dos grupos estructurales principales: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (PME). El LPS, componente predominante, es estructural e inmunológicamente similar al LPS de los microorganismos gramnegativos. Entre las PME, se han descrito varias y una proporción considerable está representada por lipoproteínas como las LipL32, LipL 21, OmpL1, LipL41 y LipL 71. Otras PME descritas son LigA, LigB y Loa22 (Figura 8.1).

Desde el punto de vista inmunológico, estas estructuras constitutivas cumplen una función central en la interacción con el hospedador, desarrollo de la enfermedad y generación de la respuesta inmune. Particularmente, estructuras como las lipoproteínas, el LPS y el peptidoglicano contienen secuencias moleculares conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), por sus siglas en inglés, que son las que interactúan con los receptores tipo Toll (TLR) presentes en las células efectoras iniciando la respuesta del sistema inmune del hospedador.

Por lo expuesto, el conocimiento y estudio de la estructura y función de estos componentes celulares contribuye a comprender mejor los mecanismos que utilizan las leptospiras patógenas para causar daño en su hospedador.

Figura 8.1. Representación esquemática de un corte transversal de una leptospira.



Nota: Cilindro protoplasmático (PCP), peptidoglicano (PG), membrana interna (IM), endoflagelo (F), espacio periplásmico (PS) y membrana externa (OM). Los antígenos de superficie son: LPS: lipopolisacárido. OMPL: por sus siglas en inglés Outer Membrane Proteins o proteínas de la membrana externa; LigA/B: proteínas que pertenecen a un grupo de proteínas de alto peso molecular parecidas a las inmunoglobulinas; LipL: lipoproteína de leptospira; Lip: lípidos; Lsa: por su sigla en inglés leptospiral Surface adhesión o adhesina de superficie de leptospira.

Epidemiología y signos clínicos

La epidemiología y presentación de la enfermedad depende de la dosis infectante, virulencia de la cepa y estado inmune del animal. En bovinos, al igual que otras especies animales, se describen infecciones incidentales cuando los serovares involucrados son aquellos no adaptados al hospedador tales como cepas patógenas de *L. interrogans* serovar Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y otros. Además, los bovinos son reservorios de *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis, adaptado a esta especie.

En Argentina, las formas agudas y severas de leptospirosis bovina se asocian con mortalidad de animales jóvenes y abortos en forma de tormenta en hembras gestantes (que pueden alcanzar el 50 %), siendo Pomona el serovar generalmente responsable. Los terneros presentan fiebre, ictericia y hemoglobinuria. Los abortos suelen presentarse en el último tercio de la gestación, con muchos animales presentando retención de la placenta. El serovar Hardjobovis se ha aislado en Argentina de hembras con abortos en el tercio medio de la gestación (rodeos de carne, con porcentajes que no superaron el 4 %), pero la literatura lo relaciona también con infertilidad, mortalidad embrionaria temprana, mastitis con drástica caída en la producción láctea y nacimiento de terneros débiles.

Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis implica pruebas que se dividen en dos grupos: pruebas directas (buscan poner en evidencia el agente o su ADN) y pruebas indirectas (investigan la presencia de anticuerpos). La prueba indirecta de referencia que se utiliza para el diagnóstico serológico de la leptospirosis es la MAT o test de microaglutinación, por sus siglas en inglés. Las pruebas directas son el cultivo, inmunofluorescencia directa y PCR.

Inmunoprofilaxis

Las vacunas de uso veterinario para prevenir la leptospirosis aprobadas y actualmente utilizadas en todo el mundo, tanto para perros, bovinos y cerdos, son vacunas de producción convencional, a soma bacteriano, muertas por calor o tratamiento químico y de administración parenteral. La mayoría de las vacunas son polivalentes y contienen entre varios serovares, seleccionados de acuerdo a la especie animal y región geográfica en la que se va a administrar.

En líneas generales, al ser vacunas a soma bacteriano, la respuesta humoral protectora generada depende sobre todo del contenido de LPS y requiere una revacunación semestral o anual, generalmente previo a los períodos de mayor riesgo. Con respecto a su eficacia, no permite la eliminación de la bacteria de los túbulos renales de animales previamente infectados, por lo tanto se recomienda vacunar a los animales antes de una posible exposición.

La protección es serovar específica. Así, las vacunas protegen únicamente contra los serovares incluidos en su composición y por esto deben conocerse previamente los serovares que afectan a las diferentes especies en una región determinada. Argentina, a través del SENASA, controla la potencia y calidad de las vacunas que se comercializan para prevenir la leptospirosis mediante un modelo de vacunación y desafío en hamsters, prueba reconocida internacionalmente que garantiza su efectividad. Es un mito que las vacunas deben elaborarse con “aislamientos locales”. Pero sí deben resistir el desafío de cepas virulentas aisladas en la región donde se van a aplicar.

Particularmente en bovinos, se aplican vacunas conocidas comercialmente como “reproductivas” que contienen serovares de leptospiras, virus y otras bacterias en su composición y también vacunas específicas compuestas exclusivamente por diferentes serovares de leptospira inactivados. Como adyuvante, utilizan en su mayoría hidróxido de aluminio, son de administración parenteral subcutánea y pueden ser administradas a las diferentes categorías, recordando siempre que la primovacunación requiere de la aplicación de 2 dosis, con un intervalo de 21 a 30 días entre cada una.

Muchas veces se vacuna para prevenir los abortos y no se contempla la vacunación de los terneros. Esta categoría, una vez perdida la inmunidad calostrual, corre el riesgo de sufrir un brote que puede provocar elevada mortalidad. Es recomendable vacunar los terneros a temprana edad.

En los tambos, la vacunación debería ser obligatoria no solamente para prevenir las potenciales pérdidas económicas, sino para proteger a las personas. Es responsabilidad del Médico Veterinario estimular la correcta inmunización de los rodeos y el uso de elementos de protección personal en los operarios.

Por las propias características del microorganismo, su capacidad para colonizar diferentes especies animales que actúan como reservorios y sobrevivir en el medio ambiente, la leptospirosis no se puede erradicar. Pero sí controlar mediante la vacunación, el control de roedores, el saneamiento ambiental, el diagnóstico y la capacitación del personal.

Referencias bibliográficas

- Di Azevedo, M. I. N., Borges, A. L. D. S. B., Kremer, F., de Melo, J. D. S. L., Carvalho-Costa, F. A., & Lilenbaum, W. (2023). Genetic Analysis of LigA, LipL32, Loa22, and OmpL1 Antigens from *Leptospira* spp. Sejroe Serogroup: How Close We Are To a Vaccine Against Bovine Leptospirosis?. *Current microbiology*, 80(9), 310.
- Haake, D. A., & Zückert, W. R. (2015). The leptospiral outer membrane. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 187–221.
- Hsu, S. H., & Yang, C. W. (2022). Insight into the Structure, Functions, and Dynamics of the *Leptospira* Outer Membrane Proteins with the Pathogenicity. *Membranes*, 12(3), 300.
- Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41–47.

CAPÍTULO 9

Vacuna contra la Colibacilosis

Eduardo Mortola

Introducción

Colibacilosis, también conocida como infección por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o colibacilosis septicémica, es considerada como una de las principales causas de muerte prematura de terneros, que enfrenta tanto producción de ganado lechero como la de carne, provocando grandes pérdidas económicas. La transmisión se produce con mayor frecuencia por vía oral-fecal mediante la ingestión de alimentos y agua contaminados; sin embargo, se cree que la infección a través de la vena umbilical y la vía nasofaríngea ocurre en ciertos serotipos de *E. coli*. Se considera que aproximadamente el 30% de los terneros diarreicos con signos clínicos sistémicos graves son bacteriémicos o septicémicos, siendo *E. coli* el patógeno más comúnmente aislado en hemocultivos. Por lo expuesto, se deben llevar a cabo medidas de control y prevención mediante el uso de vacunación de las madres antes del parto, mejorar la higiene durante el parto y apuntar a una transferencia pasiva de la inmunidad adecuada.

Agente etiológico

Entre los grupos de *E. coli* patógenas, la causa más común de diarreas neonatales son las cepas enterotoxigénicas que producen el antígeno de adhesión K99 (F5) (*E. coli* K99+) y las enterotoxinas termoestables (STa o STb) y/o termolábiles (LT1 o LT2).

La estructura antigénica de esta bacteria comprende: el antígeno O (somático) que no pueden distinguirse de la fracción antigénica de la endotoxina y se encuentran localizado en la pared celular constituyendo parte del complejo lipopolisacárido; el antígeno K termolábil que inhiben la aglutinación con sueros específicos anti O, son los antígenos de la cápsula, una excepción es el k 88 de naturaleza proteica que existe en los pilis o fimbrias; el antígeno H flagelar es de naturaleza proteica termolábil y no todas las *E. coli* lo tienen y el antígeno F de los pilis o fimbrias.

Transmisibilidad y patogenia de la enfermedad

La fuente primaria de infección son las heces de animales infectados, incluidas las madres y los terneros recién nacidos con diarrea, que actúan como multiplicadores de los microorganismos. La invasión ocurre principalmente a través de la mucosa nasal y orofaríngea, pero también puede ocurrir a través del intestino o del ombligo y venas umbilicales. En grupos de terneros la transmisión es directa contacto nariz a nariz, aerosoles urinarios y respiratorios, o como resultado de la succión del ombligo o del contacto fecal-oral.

La colibacilosis sistémica ocurre frecuentemente en terneros, corderos y aves de corral. Las cepas bacteriémicas de *E. coli* pasan a través de la mucosa del tracto alimentario o respiratorio y entran al torrente sanguíneo donde pueden causar una infección generalizada (colisepticemia) o una infección localizada como meningitis y/o artritis en terneros y corderos. Esto ocurre comúnmente en terneros hipogammaglobulinémicos, con una falla en la transferencia pasiva de la inmunidad, pero también puede ocurrir en algunos animales alimentados con calostro que no han podido absorber las inmunoglobulinas.

Las cepas de *E. coli* enterotoxigénica poseen una combinación de factores de fijación y enterotoxinas que son necesarios para que se produzca la enfermedad intestinal completa. Los factores de fijación de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica son proteínas integrales o pilis especializados que se adhieren firmemente a los receptores de glicoproteínas de los enterocitos intestinales, estos receptores sólo están presentes durante un tiempo limitado. Estos factores de fijación se conocen actualmente como antígenos fimbriales F4, F5, F6, F41 y F107, aunque todavía son conocidos por sus denominaciones anteriores de K88, K99 y 987P. Esta unión y adherencia le permite a la bacteria resistir a los movimientos intestinales normales, coloniza el intestino y produce toxinas termolábiles y termoestables (LT y ST). Estas toxinas actúan sobre las células intestinales causando diarrea hipersecretora con salida de flujo hacia el lumen intestinal, pero sin un daño celular importante. Esta salida de líquido se produce porque aumenta el nivel de la adenosin monofosfato cíclico (AMP) con intervención de las endotoxinas termolábiles y la guanosin monofosfato cíclico (GMP) por las toxinas termoestables.

El daño principal de las diarreas es la pérdida de agua y electrolitos (sales corporales) que causan deshidratación y alteración del equilibrio ácido/base de los fluidos corporales. Inflamación del intestino que perjudica la capacidad del ternero para digerir nutrientes, con pérdida de peso y la potencial hipoglucemia. Si no se tratan, estos cambios pueden ser lo suficientemente graves como para provocar la muerte.

Diagnóstico

Generalmente las infecciones por *E. coli* en animales se diagnostican de manera sintomática. Las pruebas diagnósticas, utilizadas con poca frecuencia, incluyen el aislamiento de la bacteria y la caracterización bioquímica. Dentro del grupo de *E. coli*, las cepas individuales se identifican

mediante métodos serológicos. Estos tipos serológicos se pueden dividir o clasificar según características bioquímicas, susceptibilidad a fagos y susceptibilidad a colicinas. Asimismo, los métodos directos de diagnóstico incluyen las técnicas moleculares como la PCR con muchas de sus variantes. Hay tres antígenos principales de *E. coli* que se utilizan en su identificación: antígenos somáticos O, antígenos K que se presentan en forma de cápsulas o microcápsulas y antígenos H o flagelar.

La falla en la transferencia pasiva de inmunidad es el factor predisponente más importante para adquirir la enfermedad. Una falla en la transferencia pasiva de la inmunidad detectada dentro de las primeras 12 horas de vida del ternero, por métodos simples como la coagulación por el glutaraldehído o el inmunocrito, brinda un dato muy importante para instaurar una terapia de sustitución con el fin de elevar el nivel de inmunoglobulinas séricas en el neonato.

Respuesta inmune

La IgA y las células inmunes específicas del tejido linfático asociado al intestino (GALT) son importantes para impulsar una respuesta del huésped hacia especies bacterianas invasoras. La IgA secretora de la mucosa es un componente clave en las defensas intestinales y actúa como barrera al bloquear la adherencia bacteriana y la translocación a través del epitelio. Asimismo, las respuestas mediadas por células en la mucosa pueden desempeñar un papel en el control de la adhesión bacteriana. Las células T CD4+ dentro de la mucosa intestinal y los ganglios linfáticos asociados del bovino responden a cepas bacterianas patógenas de *E. coli*. Asimismo, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden desempeñar un papel en el apoyo a una respuesta inmune productiva, ya que activarán estas células para secretar IFN γ e IL-17, lo que conduce a una mayor activación de macrófagos y, por consiguiente, destrucción bacteriana. La respuesta proinflamatoria impulsada por IFN γ junto con la captación y el procesamiento de antígenos de *E. coli* por las células T $\gamma\delta$ periféricas, puede ser un mecanismo importante de respuesta inmunológica productiva a ciertas *E. coli* enteropatógenas. Es probable que las respuestas humorales enfocadas hacia los anticuerpos anti pilis o fimbrias, anticuerpos anti-soma o capsulares y los anticuerpos neutralizantes de las toxinas, juntamente con la respuesta celular contra la *E. coli* patógena, desempeñen un papel importante en la limitación de la colonización intestinal.

Vacunas

Todas las vacunas para uso en ganado incluyen el antígeno fimbrial F5 (K99), mientras que las destinadas a cerdos incluyen el F4 (K88), F5 y F6 (987P). Algunas vacunas también incluyen F41.

La mayoría de las vacunas contra la colibacilosis son diseñadas conjuntamente para proteger contra otras enfermedades, conteniendo antígenos de otros patógenos como *Pasteurella sp.*, *Bordetella sp.*, *Clostridium sp.*, rotavirus y coronavirus).

En Argentina las vacunas son inactivadas, de uso parenteral y producidas con cepas con fimbrias o pilis K88 cerdos o K99 en bovinos. Es importante vacunar a las madres con dos dosis durante el primer embarazo (entre el séptimo y octavo mes de preñez y, en porcinos, 15 a 20 días antes del parto) y una sola dosis de refuerzo durante cada preñez siguiente.

Otra cepa que se utiliza en la vacuna es la *E coli* J5, que induce la síntesis de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con otras *E coli*. La cepa del *E. coli* J5 empleada en las vacunas, es una mutante rugosa de la *E coli* 0111:B4, con antígenos conservados en otras enterobacterias. Las vacunas se aplican en los casos de mastitis porque al limitar la mastitis se evita una posterior infección de los terneros.

Un equipo de investigación del INTA obtuvo una vacuna recombinante capaz de reducir la colonización de *E. coli* enterohemorrágica en bovinos, principal reservorio de la bacteria y agente del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad sistémica grave que afecta principalmente a los niños menores de 5 años.

El ganado bovino es una de las principales fuentes de infección para los humanos. A través de los alimentos, el agua y de persona a persona a través de las manos, también por el contacto directo con animales y su materia fecal. La vacunación del ganado bovino reduciría la excreción bacteriana, disminuyendo así la contaminación de la carne bovina y otros alimentos.

Esta es una vacuna a proteínas recombinantes que reduce la carga bacteriana en los vacunados, al generar una respuesta de anticuerpos que pueda bloquear la unión del patógeno al tracto gastrointestinal y, de ese modo, inhibir o disminuir la colonización.

Referencias bibliográficas

- Bashahun, G.M. y Amina, A. (2017). Colibacillosis in calves: A review of literature. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2(3): 62-71.
- Cox, E., Melkebeek, V., Devriendt, B., Goddeeris, B.M. y Vanrompay, D. (2014). Chapter 14: Vaccines Against Enteric *E. coli* Infections in Animals. In book: *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*. Publisher: Caister Academic Press Editors: Stefano Morabito.
- Donnenberg, M. (2002). *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2nd Edition. Baltimore. Maryland. USA.
- Harley, W., Moon, H.W., Bunn, T.O. (1993). Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine*, 11(2): 213-220.
- Schaut, R.G., Boggiatto, P.M., Loving, C.L. y Sharma, V.K.. (2019). Cellular and Mucosal Immune Responses Following Vaccination with Inactivated Mutant of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep* 9, 6401.
- Soriano Toloza, M.F. (2014). Evaluación de la efectividad de la vacuna *Escherichia coli* K99 en bovinos de leche en dos fincas en la sabana de Bogotá. Tesis Medicina Veterinaria. Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medicina Veterinaria.
- Williams, N.D., Torres, A.G., Lloyd y S.J. (2010). Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia Coli*. *Pathogenic Escherichia Coli in Latin America*. Alfredo G. Torres Ed.. Bentham Science Publishers Ltd. Cap. II. pp. 8-24.

TERCERA PARTE

Vacunas virales

CAPÍTULO 10

Vacuna contra la fiebre aftosa

Alejandra Edith Larsen y Sergio Rafael Herrera Sampons

Introducción

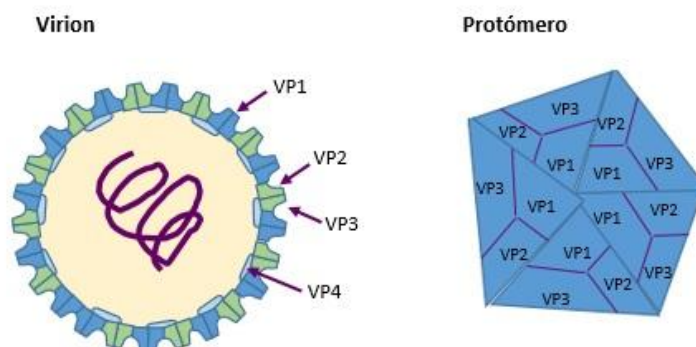
La fiebre aftosa (FA) o glosopeda es la enfermedad más contagiosa de los mamíferos biungulados. Es una enfermedad de curso agudo y a pesar que no causa la muerte en animales adultos, es responsable de grandes pérdidas económicas. Es una enfermedad que está presente en todo el mundo, pero gracias a la vacunación pudo ser erradicada en varios continentes: Europa occidental, América del Norte y Australasia.

Agente Etiológico

La FA está causada por un virus del género *Aftovirus*, de la familia *Picornaviridae*. Existen siete serotipos de virus de la FA: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1. Como lo indica su nombre, tienen distribuciones geográficas distintas, Asia 1 y los territorios de África del Sur (SAT) tipos 1, 2 y 3. Los serotipos A, O y C son de amplia distribución mundial. La infección con un serotipo o subtipo determinado no confiere inmunidad cruzada. Dentro de los serotipos se pueden identificar muchas cepas que pueden no dar reacción cruzada con las cepas de aislamientos previos.

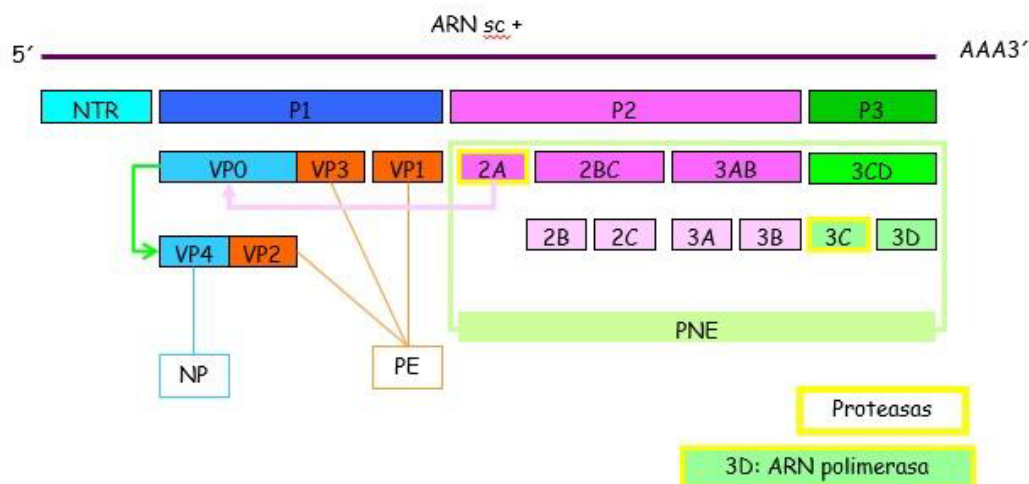
El virus de la FA tiene un genoma de ARN monocatenario sentido positivo. La partícula de virus se compone de una única copia del genoma encapsidado por 60 copias de las 4 proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, y VP4 de virus de la FA. Una copia de VP1, VP2, VP3, VP4 y proteínas forma un protómero; 5 protómeros conforman un pentámero; y 12 pentámeros forman una cápside viral completa (Figura 1). La proteína VP1 presenta un bucle entre los residuos 140-160 que representa una zona conservada que se relacionan con integrinas relacionadas con el inicio de la etapa de adsorción celular y es un importante sitio de neutralización del virus.

Figura 10.1. Esquematización del virus de la FA. Virus no envuelto, esférico, de 30 nm de diámetro, con cápside que rodea el genoma de ARN desnudo.



El genoma codifica proteínas estructurales que constituyen la cápside y también codifica proteínas no estructurales (Figura: 2) como son las proteínas asociadas a la replicación: ARN polimerasa, clivasas. El genoma ARN monocatenario sentido positivo actúa como ARN mensajero que se traduce en proteínas estructurales y no estructurales, capaces de completar un ciclo en 4 hs y producir 100.000 partículas por célula (Figura 10.2).

Figura 10.2. Esquematización del genoma del virus de la FA y producto de su traducción.



Características de la enfermedad

La patogenia de la enfermedad se puede resumir en una serie de eventos a tiempos bien definidos. En el siguiente cuadro se esquematizan los eventos que se desarrollan en un bovino luego de la infección con el virus de la FA (Tabla 10.1). No es una enfermedad zoonótica aunque el hombre puede infectarse rara vez y accidentalmente, evento relacionado con personas que trabajan en contacto directo con el virus.

Tabla 10.1. Patogenia de la Fiebre Aftosa

Inhalación o ingestión del virus	24 – 72 h
Infección de células de la zona nasofaríngea y esófago	
Replicación del virus y diseminación a zonas adyacentes	
Infección de nódulos linfáticos	
Infección de células epiteliales (boca, miembros, ubre)	
Comienzo de la fiebre	72 – 96 h
Aparición de vesículas en boca, miembros, ubres	
Salivación, descarga nasal y claudicaciones	
Ruptura de vesículas e intensificación de los síntomas	120 h
Final de la fiebre	
Final de la viremia y comienzo de la producción de anticuerpos	
Disminución de título de virus en varios tejidos y líquidos	Desde el 8° día
Cura de lesiones, el animal comienza a comer	Desde el 10° día
Desaparición gradual de virus en tejidos y líquidos	Desde el 15° día
Aumenta la producción de anticuerpos	
Cura completa. El virus persiste en la faringe	Pasados los 15 días

Vacuna contra la fiebre aftosa

Historia

La historia de la vacuna contra la aftosa es realmente fascinante, asociada a nombres muy importantes de la época dorada de la microbiología. Hasta 1926 todavía se seguía utilizando el método de suero-virus, ya en la década del '30 se comenzó a buscar métodos de cultivo *in vitro* donde se pudieran propagar el virus. Con este propósito, H. S. Frenkel desarrolló un método de partida en la evolución de la industria de la vacuna contra la aftosa. Se basaba en recuperar el epitelio lingual de vacas inmediatamente después de ser sacrificadas en el matadero y cultivar en suspensión en un medio relativamente simple. Luego de una etapa de multiplicación viral, se separaban epitelio y detritus celular por centrifugación. A esta suspensión viral se le agrega cloroformo y formaldehído y finalmente era adsorbida en hidróxido de aluminio. Las dosis que se utilizaban en esta época eran increíbles, dosis de 30 ml. El mejoramiento de la técnica de concentración y el agregado de adyuvantes permitió en algunos años bajar a 15 ml. Partiendo de una coyuntura donde Europa sufría 320.000 focos por año en 1952, la aplicación de esta vacuna permitió disminuir muchísimo el número de focos. Este excelente

resultado generó exceso de confianza en los granjeros y fueron suspendiendo la vacunación. Esta decisión supuso un desastre económico para los productores de vacunas y se generaron alianzas entre países como Francia y Argentina junto al laboratorio Merieux que se asociaron para la producción de vacunas, convenio que se replicó en otros países de Eurasia y África. El objetivo de estas alianzas fue descentralización de la producción para disminuir riesgos. Como consecuencia de la decisión de los granjeros de dejar de vacunar, en 1956 se produjo un nuevo brote generalizado en toda Europa.

Una de las estrategias para disminuir el volumen de la dosis, aparte de mejorar métodos de concentración, fue adicionar saponina como adyuvante, logrando una dosis de 5ml con la que se logró vacunar el 80% de los animales generando en ciertas regiones el estado de casi libre de la enfermedad.

Para evitar que los granjeros tomarán decisiones que ponían en peligro la sanidad en el ganado, a partir de 1961 el gobierno requiere que se vacune obligatoriamente cada 6 meses. Con la reducción de la dosis más el rifle sanitario, se completa la estrategia de control. En la década del '70 se reemplazaron los inactivantes formol y glutaraldehído por etilenimina binaria, mejorando los controles de inactivación. Hoy en día se reemplazó el método de Frenkel por el cultivo en células de embrión de hámster.

Características y clasificación

Existen dos tipos de producción industrial o *stock* vacunas que determinan la clasificación; vacunas de producción convencional y vacunas de nueva generación.

Vacunas de nueva generación

Los avances recientes en genética inversa y tecnología de cADN infeccioso, bioinformática asociados a los avances en ingeniería genética y tecnologías de ADN recombinante, han provocado una revolución en el diseño racional de las vacunas contra la fiebre aftosa que contemplen una optimización de la estabilidad de la cápside, compatibilidad antigénica, capacidad DIVA y bioseguridad. A esto último se suma la investigación avanzada sobre nuevos adyuvantes y su incorporación a las vacunas contra la fiebre aftosa podría mejorar la inmunogenicidad e incluso ampliar la duración de la protección.

El objetivo de las vacunas de nueva generación (VNG) es lograr la misma o mejor cobertura que las vacunas convencionales, pero sobre todo y más en esta enfermedad, este tipo de vacunas tiene la gran ventaja de evitar la manipulación de virus durante la producción, llevando a cero el riesgo de escape. La ventaja en bioseguridad es clave ya que el virus es de altísima diseminación y se necesitan laboratorios de producción con gran infraestructura en bioseguridad para evitar escapes. Estos eventos son devastadores en zonas libres de la enfermedad, como se comprobó en el 2001 en Reino Unido, que dio lugar al último brote registrado en Europa.

Hay varios desarrollos en distintas etapas de avance. Se desarrolló una vacuna viva atenuada a la que le han deleteado un gen de virulencia responsable de inhibir la inducción del ARNm del interferón; otro desarrollo es una vacuna quimérica construida a partir del virus de aftosa y el virus de la rinitis bovina; también existen varios desarrollos de vacunas a ADN en sinergia con citoquinas que han demostrado buenos resultados aunque tienen grandes desventajas como la necesidad de varias dosis a altas concentraciones de inmunógeno, son propensas a la generación de anti-anticuerpos contra ADN del animal vacunado.

Las vacunas peptídicas tienen grandes ventajas en relación con las vacunas convencionales inactivas como el bajo costo de producción, no sólo por los sistemas de producción recombinante, sino que, en términos de bioseguridad, son mucho menos exigentes; también son mucho más estables. Existen varios desarrollos aprobados en China y uno de ellos es una vacuna para cerdos que contiene una proteína recombinante quimérica, multiepítotope, que presenta tanto epítopes para linfocitos T y linfocitos B,

Otras VNG en desarrollo son vacunas que utilizan vectores virales activos que contienen la proteína VP1, se han utilizado vectores virales como adenovirus humano y canino, virus Semliki forest, virus Sendai, virus vaccinia y también vectores de virus que afectan al bovino como los virus de la rinotraqueitis bovina, herpesvirus bovino y enterovirus bovino.

Independientemente de la variedad y cantidad de vacunas de nueva generación experimentales, los resultados hasta ahora son de protección parcial en bovinos y cerdos, pero la mayoría están en etapa de desarrollo o preclínico sin haber pasado a fase I, donde se prueban en el hospedador natural.

Se han desarrollado vacunas a partículas similares a virus (VLP según su sigla en inglés de *virus like particles*) a partir de varios sistemas de producción recombinante de proteínas, incluyendo sistemas eucariotas (levaduras, báculo virus en células de insecto, plantas) y procariotas (E. coli) a pesar que solo una ha demostrado protección en bovinos, aun no ha sido aprobada en ningún país del mundo la protección en cerdos.

Stock vacuna convencional

La única vacuna contra aftosa aprobada por el SENASA en nuestro país es una *stock* vacuna de producción convencional. El sustrato vacunal es el virus de la fiebre aftosa entero, inactivado y homólogo. Es una vacuna polivalente, que en los últimos años y por las características epidemiológicas de la enfermedad en la región, pasó a ser tetravalente. Las cepas incluidas en la vacuna son: O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, C3 Indaial. También contiene adyuvante, hidróxido de aluminio más saponina, o adyuvante oleoso como aceite mineral. La administración es parenteral, intramuscular, no protege contra la infección y su función es profiláctica y metafiláctica, según la situación epidemiológica al momento de su utilización. Esta vacuna inactivada actúa como vacuna DIVA (por su sigla en inglés: *differentiation of infected from vaccinated animals*), que significa que existen pruebas diagnósticas capaces de no tener interferencia con

anticuerpos vacunales. Específicamente, estos métodos diagnósticos detectan anticuerpos contra proteínas no estructurales, que no están presentes en la vacuna.

Las principales desventajas de las vacunas inactivadas incluyen el requisito de un laboratorio altamente controlado, laboratorio de bioseguridad III, para evitar la liberación del virus de la fiebre aftosa durante la producción de vacunas, la necesidad de incluir varios serotipos así como la necesidad del estricto mantenimiento de la cadena de frío, ya que el virus de la fiebre aftosa es muy sensible al calor.

Producción de vacuna contra la FA

Obtención de Cepa- Inmunógeno vacunal

La vacunación contra un serotipo de la FA no proporciona una protección cruzada contra otros serotipos e incluso puede darse el caso de que no proteja contra otras cepas del mismo serotipo. Por esto es sumamente importante obtener cepas de brotes que afecten a la región de cría de ganado susceptible y poder cotejar características inmunogénicas con las cepas vacunales.

- Selección de virus naturales para la concordancia de vacunas. Selección de cepas vacunales concordantes.

La selección de la cepa vacunal adecuada es central para el control de la FA mediante programas de vacunación, así como para el establecimiento y mantenimiento de reservas de inmunógenos vacunales que se puedan utilizar en caso de que surjan nuevos brotes. En estos tiempos ya existen reservas de inmunógenos vacunales contra los cuales se prueba el virus aislado en un brote. Para evitar los riesgos de la manipulación de virus, existen varios métodos serológicos *in vitro* que cuantifican las diferencias antigénicas entre las cepas aislada del brote de FA y, a partir de ahí, estimar la probable protección cruzada entre una cepa vacunal y un aislamiento natural. A este proceso se lo denomina "concordancia vacunal". La caracterización genética (análisis de secuencia del gen VP1) y el perfil antigénico (mediante la prueba de Fijación de Complemento o ELISA) también pueden revelar la emergencia de nuevas cepas para las que se requiera la concordancia vacunal y, a la inversa, pueden indicar que un aislamiento dado es similar a otro para el que ya se dispone de información sobre concordancia vacunal.

Por lo tanto, las cepas vacunales pueden ser cepas aisladas en un brote, en el caso que no presenten concordancia vacunal con los inmunógenos vacunales en *stock*, ya caracterizados. En este sentido si la cepa del brote tiene concordancia vacunal con las cepas *stock*, se utilizarán estas últimas para formular la vacuna.

- Validación como cepa vacunal

Los virus del inóculo primario (el que se emplea para la producción) deben estar caracterizados antigénicamente y, si es posible, también genéticamente. También se debe demostrar que son puros y están libres de todos los agentes extraños declarados por la autoridad competente.

Debe establecerse la homología con los aislamientos originales candidatos y debe demostrarse la efectividad contra las cepas circulantes de las que ellos se derivan.

Método de producción

El método de propagación del virus recomendado para la producción del inmunógeno vacunal es el crecimiento de virus de la FA en grandes cantidades de cultivos en suspensión o en monocapa, utilizando líneas celulares en condiciones de esterilidad. Es importante destacar que el virus es vulnerable a la acción de enzimas proteolíticas, como las producidas por microorganismos. También resulta crítico el control del pH y de la temperatura debido a la labilidad del virus a estos factores. Ambos parámetros de cultivo deben controlarse con precisión. La temperatura óptima para el crecimiento celular y vírico está en el rango de los 37°C, la temperatura de desnaturalización está alrededor de 26°C. Durante las siguientes fases de la producción, la temperatura debe reducirse a 4-6°C. Los virus deben mantenerse a un pH cercano a 7,6 y nunca por debajo de 7,0. Se utiliza una cepa adecuada de virus para infectar una suspensión o monocapa de una línea celular establecida, como células de riñón de hámster bebe o BHK (por su sigla en inglés). Tales cultivos deben estar libres de microorganismos contaminantes, como virus adventicios, bacterias, hongos. Cuando el virus alcanza su título máximo, lo cual se determina por infectividad, fijación de complemento y otras pruebas, el cultivo se clarifica, a menudo tratándolo con cloroformo seguido de centrifugación y filtración. A continuación, el virus se inactiva añadiendo etilenimina, normalmente en forma de etilenimina binaria (BEI) que se añade a la suspensión de virus mantenida a 26°C. Normalmente, la inactivación se prolonga durante 24 horas, seguida de una segunda dosis de BEI durante otras 24 horas más. La duración del tratamiento con BEI y la temperatura utilizada para la inactivación debe validarse según cada caso o laboratorio. Después de la inactivación, la neutralización de cualquier BEI residual en el producto se neutraliza con una solución de tiosulfato. El virus inactivado se puede concentrar por ultrafiltración, precipitación con polietilenglicol o adsorción con óxido de polietileno; el virus concentrado e inactivado puede purificarse aún más por procedimientos más sofisticados como la cromatografía. Si es necesario, esta solución madre de inmunógeno vacunal concentrado se puede mantener a -70°C o a temperaturas más bajas durante muchos años. Normalmente, las vacunas convencionales contra la FA se presentan en forma acuosa y con adyuvante oleoso. En la formulación final, la vacuna acuosa se prepara adsorbiendo el virus en gel de hidróxido de aluminio como adyuvante. Otros componentes del producto final incluyen antiespumante, rojo de fenol (dependiendo de la legislación de cada país), hidrolizado de lactoalbúmina, caldo de triptosa con fosfato, aminoácidos, vitaminas y sales tamponadas. También se incorpora un segundo adyuvante, la saponina, y merthiolate/cloroformo como conservante. Las vacunas con adyuvante oleoso se formulan utilizando aceites minerales de alta calidad, como Marcol y Drakeol. Las vacunas oleosas tienen varias ventajas sobre la vacuna estándar con hidróxido de aluminio/saponina, sobre todo su eficacia en los cerdos por la prolongación de la duración de la inmunidad. El aceite mineral se pre-mezcla, por lo general, con un agente emulsionante, como el monooleato

de manosa, antes de añadir una proporción o el total de la fase acuosa de la vacuna, y se emulsiona mediante un dispensador coloidal, o un emulsificador mecánico continuo o de flujo ultrasónico. Se pueden producir emulsiones dobles más complejas (agua/aceite/agua), emulsionando de nuevo en una fase acuosa que contenga una pequeña cantidad de detergente, como Tween 80. Una alternativa adicional es la representada por los adyuvantes oleosos "listos para usar" ha supuesto un avance significativo en los últimos años. Los aceites con ésteres del ácido octadecenoico y 2,5 anhidro-d-manitol, por ejemplo, forman fácilmente emulsiones dobles o mezcladas (agua/aceite/agua) que son estables y de baja viscosidad sin que se necesite un equipo emulsionantes sofisticado. Cuando se utilizan componentes novedosos, incluido el adyuvante oleoso, en cualquier vacuna, es importante tener en cuenta que debe evaluarse su estatus relativo a los residuos en productos derivados de especies usadas en la fabricación de alimentos para garantizar a la autoridad expendedora de licencias la inocuidad para los consumidores. Este requisito limita de forma considerable la gama de adyuvantes que se pueden utilizar en especies utilizadas en los alimentos.

Controles de Proceso

Estos controles se realizan en cada una de las etapas midiendo parámetros en los diferentes puntos críticos. El control de pH y temperatura o control de inactivación, son controles claves para la calidad de la vacuna².

Controles de producto final

Las pruebas sobre el producto final que deban utilizar ganado vacuno se realizan bajo supervisión del SENASA.

Inocuidad: En un número adecuado de cabezas de ganado se realiza una prueba de toxicidad local y sistémica sobre un lote de ensayo de vacuna.

Potencia: La prueba de potencia se puede realizar en animales o por pruebas serológicas. Los animales utilizados son bovinos que deben cumplir ciertas características (más de 6 meses de edad, procedentes de áreas libres de FA, sin vacunación previa contra la FA y no reactores a los diferentes tipos de virus de la FA). Se deben vacunar tres grupos de por lo menos cinco animales, y un grupo se deja como control de dos animales no vacunados.

El desafío se realiza 3 semanas (presentación acuosa) y hasta 4 semanas (aceite) post vacunación. Se utiliza una suspensión de virus bovino completamente virulento y apropiado a los tipos de virus presentes en la vacuna ensayada, se inocula por vía intradérmica en dos zonas de la superficie superior de la lengua. Los animales se observan durante por lo menos 8 días. Los animales control mostrarán lesiones en otros sitios además de la lengua y desarrollarán lesiones en al menos tres patas. Del número de animales protegidos en cada grupo, se calcula la PD50 (dosis protectora media) que contiene la vacuna.

² Para más detalles consultar al manual de la OIE (2007).

Las pruebas de potencia en otras especies, como ovejas, cabras o búfalos, o son diferentes o no están estandarizadas.

Para establecer la potencia de una vacuna también se pueden utilizar otras pruebas indirectas. Se puede utilizar seroneutralización in vivo o in vitro, ELISA.

Pureza: Es un control para determinar la presencia de anticuerpos frente a proteínas no estructurales. Según el Código de Salud de la OIE para animales terrestres, se estipula un criterio para volver a establecer un estado de ausencia de FA después de un brote. En un contexto de programa de vacunación, se testea la presencia de anticuerpos contra PNE en animales vacunados. Un procedimiento es vacunar terneros con una dosis doble de vacuna que contenga el máximo número y cantidad de inmunógenos permitidos. Estos terneros deben vacunarse al menos tres veces durante un periodo de 3–6 meses y 30-60 días posteriores realizar el serodiagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos contra las PNE. Las PNE analizadas son 3A, 3B, 2B, 2C, 3ABC y las pruebas utilizadas son ELISA convencionales o de captura y los positivos se confirman por Western blot.

Duración de la inmunidad: Para establecer un nivel satisfactorio de inmunidad, lo normal es proceder a una primera fase de dos inoculaciones, separadas 2-4 semanas entre sí, seguida por una revacunación cada 4-12 meses. La frecuencia de vacunación dependerá de la situación epidemiológica y del tipo y calidad de la vacuna utilizada.

Estabilidad: La caducidad de las vacunas convencionales contra la FA suele ser de 1-2 años a 4°C. Es un punto crítico ya que estas vacunas son sensibles a la temperatura y no deberían congelarse ni mantenerse por encima de 4°C.

Control de lote

Para mayor y detallada información consultar el capítulo de Fiebre Aftosa de la OIE (2007)

Respuesta inmune inducida por la vacunación

Inmunógeno vacunal

El producto de la replicación viral durante la producción de la vacuna da como resultado una mezcla antigénica, compuesta por proteínas irrelevantes y una pequeña cantidad de proteínas virales: proteínas estructurales (PE) y proteínas no estructurales (PNE) del VFA. Las PE incluyen: 1- partículas virales enteras (146S); 2-subunidades (75S); 3- agrupamientos de pentámeros (12S) y proteínas virales VP (1, 2, 3). La inmunogenicidad está relacionada no solo con la composición química del inmunógeno, sino por su distribución espacial en la estructura viral, las partículas virales enteras son 10 veces más inmunogénicas que las subunidades y 100 veces más inmunogénicas que los agrupamientos de pentámeros. Las partículas virales enteras deben contener a la VP1 integrada e intacta para que sea realmente inmunogénica, su alteración (por ejemplo por acción de proteasas) y a pesar de no alterar la estabilidad de la cápside, disminuye mucho la inmunogenicidad del virus y por ende la de la vacuna. No todos

los subtipos del VFA se comportan de la misma manera, el cultivo del VFA serotipo A da como resultado mayor concentración de subunidades que de partículas virales enteras, por lo tanto en la formulación aparece en mayor concentración. La pérdida de la conformación de los epítopes en la estructura de la cápside viral y la consecuente pérdida de la inmunogenicidad, hacen foco en la importancia de la integridad de la cápside viral de las vacunas convencionales y explica porque las vacunas de nueva generación presentan menos inmunogenicidad induciendo una muy pobre respuesta inmune protectora.

El VFA es una partícula relativamente inestable en términos de sensibilidad a la temperatura y el pH, lo que tiene mucha importancia en la estabilidad del inmunógeno vacunal, sobre todo cuando la cadena de frío no se respeta. La estabilidad del virus frente al pH varía según el serotipo, por ejemplo, la cepa C Noville es más lábil en medio ácido que el serotipo virales A y O, la integridad e infectividad de la partícula viral se ve afectada cuando el pH está por debajo de pH 7 y 7,5 respectivamente. La infectividad también se ve reducida cuando se sobrepasa el pH 8 en el caso de los serotipos A y O, y por arriba de 8,5 en el caso del serotipo C. El glutaraldehído que se le agrega como excipiente a la formulación vacunal tiene como función prolongar la estabilidad de la partícula.

Las PNE no generan respuesta inmune protectora, ya que los anticuerpos específicos contra ellas tienen poco o nula capacidad de neutralizar a la partícula viral entera. El proceso de ultrafiltración permite conservar las partículas virales y deshacerse de las proteínas solubles entre las que se encuentran las PNE, evitando así la interferencia en el diagnóstico serológico de los animales sospechosos de padecer FA.

Respuesta humoral

Como toda respuesta primaria frente una primovacunación la primera inmunoglobulina en aparecer contra la FA es la IgM. Aparece entre el 2do o 4to día post vacunación y perdura por un largo periodo de tiempo, más de 80 días. La IgG aparece después del 4to días post vacunación y tiende a hacer el pico de concentración a los 35 días. La cinética de la respuesta humoral está sujeta al tipo de adyuvante presente en la formulación de la vacuna. El subtipo predominante de IgG inducidas por vacunas convencionales es el subtipo IgG1, en cambio en vacunas a subunidades el isotipo predominante es IgG2, teniendo en cuenta la protección estimulada por ambas vacunas, se infiere que el subtipo IgG1 es el más importante en la inmunidad humoral protectora en bovinos.

La protección vacunal después de una sola dosis de vacuna tiende a ser de corto plazo, como se señaló previamente esto depende mucho del tipo de vacuna así como de la presencia y nivel de anticuerpos maternos y su posible interferencia.

La respuesta inmune post vacunal en las mucosas es muy diferente a la respuesta que genera la infección natural. La inducción de IgA secretoria (IgAs) depende mucho del tipo de vacuna y el intervalo entre dosis. Normalmente la revacunación con vacunas convencionales no genera

niveles significativos de IgAs en mucosas. Se ha demostrado en forma experimental que varias dosis de vacunas o el aumento en varias veces la dosis vacunal en una aplicación promueve la aparición de IgAs en mucosa orofaríngea.

Las Igs que se detectan en orofaringe son tanto IgM como IgG, de esta última predomina el subtipo IgG1. Este fenómeno se ve favorecido por la reacción inflamatoria en la orofaringe que permite la trasudación de las Igs a la mucosa.

En cerdos, luego de vacunar con una formulación oleosa, aparecen anticuerpos neutralizantes a los 3 o 7 días en orofaringe, el título no se modifica por revacunación. En cambio, la respuesta humoral sistémica aumenta en cada revacunación. La vacuna agua en aceite es más efectiva en esta especie.

Respuesta celular

La vacuna contra la FA induce linfocitos T de memoria, aunque con una sola dosis la respuesta celular es débil. A diferencia de la respuesta humoral, la respuesta celular frente a la infección no parece ser muy superior a la respuesta por vacunación. La respuesta celular presenta reacción cruzada entre diferentes serotipos, no así la respuesta humoral. Esta reactividad cruzada se atribuye a los epítopes altamente conservados de la VP1, VP2 y VP3.

Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad es muy variable y depende del tipo de vacuna utilizada, ya que varía mucho la calidad del inmunógeno vacunal y los adyuvantes utilizados. Generalmente se acepta que las vacunas oleosas generan una respuesta inmune de mayor duración que aquellas que utilizan hidróxido de aluminio/saponina como adyuvante. La duración de la inmunidad de forma efectiva no depende solamente de la respuesta de memoria que pudiera establecerse luego de la vacunación, sino también del subtipo de inmunoglobulina inducido y particularmente en la magnitud de la respuesta inicial.

La inmunización a altas dosis de inmunógeno genera una alta concentración inicial de anticuerpos en suero que decrece rápidamente a bajos niveles de anticuerpos de baja afinidad. Por el contrario, dosis bajas de antígeno genera, en un principio, un aumento moderado de anticuerpos, pero que siguen aumentando en el tiempo y se consigue una concentración y afinidad mucho mayor que en dosis altas de inmunógeno.

En general la vacunación contra la FA en bovinos genera un pico de anticuerpos en el día 21 o 28 post vacunación, aunque a veces se ha registrado el pico en el día 14. El título de anticuerpos vacunales puede declinar rápidamente o mantenerse relativamente elevado por varios meses antes de caer a niveles por debajo de los de protección. Este último perfil serológico se reconoce más frecuentemente en las vacunas oleosas.

Es innegable que las vacunas contra la FA no generan inmunidad de larga duración, y por eso se hace necesaria la revacunación regular para mantener un nivel protector de anticuerpos vacunales.

Plan de control y erradicación

La naturaleza altamente contagiosa de la FA, así como el amplio rango de hospedadores que presenta, sumado a la facilidad de diseminación y dispersión del virus, tanto nacional e internacionalmente, hace de vital importancia que las autoridades sanitarias nacionales continúen controlando y auditando la producción de vacunas que garantice la alta calidad que requiere esta enfermedad. La disminución o suspensión de la vacunación en regiones endémicas supone consecuencias desastrosas para el estatus sanitario de las naciones y el mundo.

En el país existe un Programa Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa que rige desde 1994. La FA es una enfermedad de denuncia obligatoria e inmediata. Las campañas de vacunación se implementaban en forma efectiva a partir de la década del '90, la aplicación de un nuevo plan de erradicación permitió cortar la circulación viral mediante la vacunación y vigilancia epidemiológica. Con un corto periodo de “país libre de fiebre aftosa sin vacunación”, la necesidad de mantener una inmunidad poblacional sólida y persistente para contrarrestar la compleja situación regional de fronteras, sobre todo en el norte del país, se decide mejorar el plan de erradicación bajo 4 pilares fundamentales: 1-Vacunación sistemática, obligatoria y universal de los bovinos; 2- Control del mantenimiento de la cadena de frío de la vacuna; 3- Sistema eficaz de identificación de los bovinos; 4- Participación activa de los productores como parte ejecutora de las políticas delineadas a nivel nacional por el SENASA. Bajo este programa se logra la interrupción de la circulación viral para la población bovina y se solicita a la OIE el reconocimiento de “zona libre de fiebre aftosa que practica la vacunación” al territorio ubicado al norte del paralelo 42°. Otra medida importante fue establecer “Cordón fronterizo” de 25km de ancho contra las fronteras de Bolivia y Paraguay, que comprende territorios de las provincias de Salta y Formosa, extendido a las provincias de Corrientes y Misiones, territorio donde se vacuna a todos los animales susceptibles con el objetivo es evitar la introducción de la enfermedad en el territorio nacional.

Existen controversias con respecto al rol de los *carriers* o portadores, en la diseminación y mantenimiento del virus. Se define como *carrier* a aquellos animales de los que el virus de la FA puede ser aislado luego de 28 días postinfección. Algunos sostienen que esta característica por sí sola no debería ser concluyente y que, aparte, deberían ser capaces de transmitir la infección de manera comprobada. Según la especie esta condición puede no existir, por ejemplo en cerdos, o puede durar por varios años (5 en el búfalo de agua). A pesar que no se ha podido demostrar fehacientemente el rol del *carrier* como principal responsable de la transmisión del virus en un brote importante, igualmente se le atribuye cierto rol en la transmisión especialmente en

poblaciones de bovinos susceptibles o con vacunación deficiente. La implementación de campañas de vacunación adecuadas, con inmunógenos de calidad, son suficientes para reducir al mínimo la persistencia de *carriers*.

La zona libre de fiebre aftosa sin vacunación está conformada por la Patagonia al sur del paralelo 42° a la que se le suma una pequeña zona de altos valles andinos, denominada Valles de Calingasta, de la provincia de San Juan. En la siguiente Figura se puede observar el detalle de las diferentes zonas epidemiológicas de la FA en el país. Figura 10.3.

Figura 10.3. Mapa político de la República Argentina.
Detalle de las zonas epidemiológicas de la FA.



Protocolo de vacunación

El protocolo de vacunación no es sinónimo de receta y en ningún caso debería repetirse sin el debido análisis de los factores que lo influyen. La dosis está determinada en 2 ml por vía intramuscular o subcutánea en la tabla del cuello.

En el caso de la vacunación contra FA existe un comité de expertos que, conjuntamente con el SENASA, atendiendo los requisitos internacionales dispuestos por la OIE, sumado a la calidad de las vacunas aprobadas y las circunstancias del país, determinan el mejor protocolo de vacunación para controlar esta enfermedad. Para ellos se implementan medidas como las que se discuten a continuación.

Se establecen períodos de vacunación antiaftosa para bovinos por Regiones, en el Territorio Nacional, acorde al cronograma que surja de las condiciones epidemiológicas, de las características geográficas y productivas de las mismas. Se realizan dos campañas de vacunación, en una

se vacunan a todas las categorías y en la otra campaña se vacuna a animales menores de dos años. Deben vacunarse todos los animales mayores de 6 meses. En el contexto de la vacunación antiaftosa, se considera animal adulto a aquel que fue vacunado en forma consecutiva en cuatro oportunidades en los períodos correspondientes a cada plan, en los dos primeros años de vida, al resto de las categorías se los considera bovinos menores.

Lo ideal es que estos periodos de vacunación no se extiendan los sesenta días corridos, vacunando la totalidad de los bovinos existentes en el área geográfica de acción de cada plan específico. También se dispuso como medida de contención que durante los meses de vacunación establecidos en cada plan, se prohíbe el movimiento de hacienda de aquellos establecimientos que no hayan completado la vacunación y registro de la totalidad de los bovinos. Están exceptuados a esta regla los animales con destino a faena inmediata o mercado terminal, siempre y cuando no se haya excedido la fecha de vencimiento de la vacunación del establecimiento remitente.

Se considerará vacunado, a todo bovino que haya sido inoculado en tiempo y forma por personal reconocido y autorizado por SENASA; respetando en todos los casos los períodos de vacunación; los plazos intervacunales; las exigencias del programa y que sean registrados en la Oficina local del SENASA que corresponda. Se debe registrar el acto de vacunación en todos los casos, y el registro resultante debe acreditarse en el Ente Sanitario Local en la Oficina de SENASA de la jurisdicción.

A las disposiciones de SENASA se debe sumar el compromiso del productor para que las campañas de vacunación sean exitosas, para esto el establecimiento debe contar con las instalaciones mínimas e indispensables que permitan efectuar adecuadamente las tareas de vacunación, a los efectos de disminuir los riesgos del operador y accidentes vacunales. También debe conocer y acatar todas las normas relativas a la vacunación y movimiento de hacienda.

Los periodos de vacunación antiaftosa también son diseñados según las regiones. Para las Regiones Central, Mesopotámica y Patagónica Norte A, la estrategia de vacunación sistemática será la ejecución de dos campañas de vacunación en el año, cuyas fechas para cumplir con el primer período se extenderán desde el 15 de febrero al 15 de mayo de cada año, y el segundo período del 15 de septiembre al 15 de diciembre. Para las Regiones del NOA y Cuyo, la vacunación en dos campañas asimétricas al año, se cumplen en un primer período, desde el 1° de marzo al 1° de mayo y el segundo período del 1° de julio al 1° de septiembre. Estos cronogramas se ejecutan bajo la coordinación de las Comisiones provinciales de Sanidad animal (COPROSAS), encargadas de garantizar plazos establecidos aunque también podrán adoptar, cuando las condiciones de producción, ecológicas, climáticas, epidemiológicas y otras de orden Regional así lo exijan, criterios ampliatorios con la intervención y aprobación previa de la Comisión nacional de Lucha contra la Fiebre aftosa (CONALFA) y del SENASA.

Referencias bibliográficas

- Doel, T.R. (1996). Natural and vaccine-induced immunity to foot and mouth disease: the prospects for improved vaccines. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 (3) 883-911.
- Graham, J.B. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the Picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* Vol. 60, pp 241-260
- OIE. (2007). CAPÍTULO 2.1.10. FIEBRE AFTOSA. Manual de la OIE sobre animales terrestres http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.1.01_Fiebre_aftosa_2007.pdf
- SENASA. (2017). Fiebre Aftosa en bovinos y bubalinos. Estatus sanitario y vacunación. <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/fiebre-aftosa>
- VII SEMINARIO INTERNACIONAL DE CONTROL DE VACUNA ANTIAFTOSA Rio de Janeiro, Brasil 10 - 14 Septiembre, 2001.

CAPÍTULO 11

Vacuna contra la Rabia Paresiente

Graciela Miceli y Eduardo Mortola

Introducción

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda que afecta al hombre y todos los animales de sangre caliente. Es zoonótica, de alta mortalidad, epidémica y recurrente, debido a que permanece presente y circulante es de difícil control. Su denuncia es obligatoria (incorporada al Art.6° del Reglamento General de la Ley N° 3959), por parte de los veterinarios y de los productores. Está incluida en el listado del Grupo I de la Resolución SENASA N°153/21, como enfermedad de notificación inmediata. La Resolución SENASA 25/05 aprueba la creación del Programa Nacional de Control de la Rabia Paresiente en la República Argentina.

Agente etiológico

En un virus ARN, neurotrópico, forma alargada cilindro-cónica “parecido a una bala de fusil”. Pertenece al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*, se transmite a todos los mamíferos, y afecta al Sistema Nervioso Central; la transmisión al humano es por inoculación o inhalación de virus infeccioso. Tiene cinco proteínas estructurales: la G (glicoproteína) que alterna con proteínas M1 y M2 (proteínas de matriz); en la nucleocápside se encuentran las proteínas N (nucleoproteína), NS (nucleocápside) y L (transcriptasa). La glicoproteína es el mayor componente antigénico, responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes, que son los que confieren inmunidad; también tiene actividad hemoaglutinante.

En el género *Lyssavirus* se pueden distinguir siete líneas genéticas (G), las que fueron determinadas por pruebas de protección cruzada y biología molecular, el virus de la rabia clásico (RABV G1) es el que está presente en Argentina, el virus murciélago de Lagos (LBV G2), el virus Mokola (MOKV G3), el virus Duvenhage (DUUV G4), G5 a G7 corresponden a virus de murciélagos europeos y australiano.

El virus G1 presenta diferencias estructurales en su proteína N (nucleoproteína), al ser detectados por anticuerpos monoclonales permite establecer variantes antigénicas (Tabla 11.1), cada una de las cuales está adaptada a determinados reservorios y conforma un ciclo de rabia (se define como tal a la circulación del virus en un determinado ámbito a partir de reservorios

naturales), el hecho que cada variante tenga un reservorio natural, no excluye que pueda infectar a una especie no reservorio, fenómeno que se denomina “*spill over*”. Ej: el murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis*), reservorio de la variante 4 (ciclo aéreo) puede infectar a un perro o gato, pero no significa que se hayan adaptado a ellos, sino que son huéspedes finales y no un nuevo reservorio.

Tabla 11.1. Variantes de virus de Rabia y reservorios.

V1	Perro-Gato-Ciclo Terrestre-urbano
V2	Perro-Cánidos silvestres. Ciclo terrestre-rural
V3	Quirópteros hematófagos (<i>Desmodus rotundus</i>) - Ciclo aéreo-rural
V4	Quirópteros insectívoros (<i>Tadarida brasiliensis</i>) Ciclo aéreo-urbano
V6	Quirópteros insectívoros (<i>Lasiurus cinereus</i>)-Ciclo aéreo-rural-urbano
Otras	<i>Myotis spp</i> / <i>Eptesicus spp</i> / <i>Histiotus montanus</i> -ciclo aéreo

Nota: Fuente: Programa Nacional de Control de Enfermedades Zoonóticas. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud Pública.

Dentro de los virus rábico clásicos, debe señalarse la distinción entre “virus calle”, se refiere al recientemente aislado de un animal, que no ha sufrido modificación en el laboratorio, las cepas de éste virus se caracterizan por un período variable de incubación, que a veces es muy prolongado y por su capacidad de invadir las glándulas salivales y el “virus fijo”, que son cepas adaptadas al laboratorio por pasajes intracerebrales en serie y que tienen un período de incubación de 4 a 6 días y no invaden las glándulas salivales.

Historia

La rabia como tal data de 4000 a.C, lo consideraban un castigo divino. Demócrito, filósofo griego, junto con Aristóteles, hicieron una descripción detallada de la enfermedad, que se transmitía a través de la mordedura. Celsius identificó la hidrofobia como síntoma. Los ingleses la trajeron a América, aunque se sospecha que, por los murciélagos, ya existía. Entre 1514-27 en México se produjo la aparición de varios casos, en el 1800 en Europa comenzó a aparecer una gran cantidad de casos de humanos mordidos por zorros y perros. Es aquí cuando Pasteur, Roux y Chamberland realizaron la primera experiencia de una “vacuna” producida con virus propagado en tejido nervioso, médula desecada que, aplicando varias dosis, lograron salvar la vida de un niño de 9 años. En 1911, Semple produjo una vacuna “*in vivo*” inactivada con fenol, 30 años más tarde se adaptaron al cultivo en huevo, 20 años después las vacunas comenzaron a producirse en cultivo y hoy se utilizan sólo las que resultaron más eficaces y seguras.

Distribución geográfica

Se encuentra en todos los continentes con excepción de la Antártida, pero no hay datos documentados sobre estudios en esa población que demuestren la ausencia de esta enfermedad. Hay países libres y otros como Argentina, que es un país con rabia controlada con vacunación.

Patogenia y sintomatología de la Rabia Paresiente

Es una enfermedad mortal, epidémica, regional, focal y cíclica. Se debe prevenir por vacunación a los animales, en los meses previos al verano, ya que en esa época es cuando hay más circulación de vampiros. La mortalidad en el ganado puede superar el 75% (SENASA) a partir de 1986 se incorporó el estudio de aspectos epidemiológicos y ecológicos del vampiro, quien es el transmisor de la enfermedad. El virus es el mismo que causa la enfermedad en caninos y felinos, el período de incubación (PI) es de alrededor de 30 días en bovinos; cuando comienzan los síntomas pueden morir dentro de los 2 a 10 días; el cuadro se presenta con decaimiento, falta de apetito, temperatura, cese de producción de leche en los animales de tambo, se alejan, no son agresivos, sí tienen períodos de excitación, golpean con los cuernos el suelo, mirada perdida, instinto sexual exacerbado, aparece luego parálisis de la glotis, salivación, parálisis del tren posterior (denominado paresia, de ahí el nombre de paresiente), se tambalea, mal de las caderas, camina derrengado (derriengue), el mugido en el bovino como el relincho en el caballo es anormal, por la encefalitis, pierde la conciencia. No se transmite en forma horizontal porque no se muerden entre ellos, se comportan como “huéspedes finales” o “fondo de saco”, no la transmiten en forma activa.

En los bovinos rabiosos el virus puede aislarse del cerebro, ojo, lágrimas (tener cuidado con las maniobras de volteo), se aísla con poca frecuencia de glándulas salivares y tejido periférico, (para todas las maniobras que se realizan en la boca o tejidos adyacentes, deben usarse medios de protección adecuados).

Equinos, ovinos, y caprinos semejantes a bovinos.

Porcinos: excitación muy violenta, semejante a la furiosa del perro.

Aves: excepcional

Fauna silvestre (ciervos, carpincho, venado, zorro) semejante a perros.

El mapa fue actualizado en la publicación del Manual 2022 (Figura 11.1) y aproximaciones, porque se trata de una georreferencia dinámica que se va ajustando a lo largo del tiempo según el comportamiento de la enfermedad, por ello se sugiere la búsqueda de los boletines oficiales de SENASA para acceder siempre a la última actualización vigente.

Figura 11.1. Referencias en el Manual de Procedimientos de SENASA 2022

Transmisión

Se realiza por la mordedura del vampiro, en el país, por *Desmodus rotundus*, habita en huecos de árboles, cavernas, entretechos, se puede saber dónde están por la gran cantidad de materia fecal alrededor del área, semilíquida y de fuerte olor, viven en colonias de hasta 500 individuos (Figura 11.1).

Se debe considerar que, el principal vector es el vampiro, pero también especies insectívoras y frugívoras pueden transmitirla.

El vampiro común tiene características que lo diferencian en su rostro de los demás murciélagos, el hocico recuerda el de un cerdo, la dentadura está adaptada a la alimentación hematófaga: incisivos centrales superiores son triangulares, los inferiores bilobados y chicos (Figura 2), el pulgar de sus alas está muy desarrollado y se observan plantillas palmares bien diferenciadas (Figura 3). Su población es mayor cerca del ganado, que es su fuente de alimentación. A medida que progresa la enfermedad, la población disminuye, hasta quedar en niveles bajos, el brote cede. La tasa de reproducción es baja, lo que explica los largos períodos inter epidémicos (sin rabia); tienen una cría por año, el amamantamiento dura alrededor de 9 meses, las crías están en el refugio hasta los 12 meses cuando comienzan a alimentarse solas; la expectativa de vida es larga, pueden llegar a 10 años o más. Se alimentan cerca del refugio por la cantidad de sangre que consumen y les dificultan el vuelo, muerden como en sacabocado y lamen hasta 20-30 minutos, el efecto anticoagulante de la saliva,

que contiene proteínas anticoagulantes y fibrinolíticos, inhibidores de la coagulación, activadores del plasminógeno e inhibidores de la agregación plaquetaria, ayudan a mantener el sangrado mientras se alimenta, lo cual hace persistente la hemorragia.

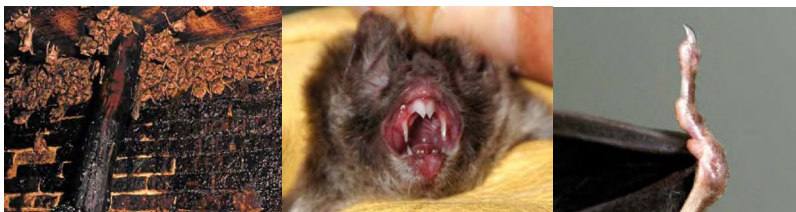


Figura 1

Figura 2

Figura 3

Manual de Procedimientos de rabia Paresiente (SENASA)

Muerden a los animales donde no pueden espantarlos, base del cuello, detrás de las orejas, alrededor de los ojos, base de la cola, mamas (más común en las cerdas). Las complicaciones de las heridas, por infecciones y miasis, en los animales jóvenes, producen muchas pérdidas económicas.

El control del vector puede realizarse a través de la utilización de vampiricidas a base de sustancias anticoagulantes, se aplican en el dorso y vientre de los murciélagos previamente atrapados, al acicalarse entre ellos consumen dicha sustancia que les causará una hemorragia interna y la posterior muerte, éste es un método selectivo y se aprovechan los hábitos de limpieza del murciélago. Tienen transmisión intraespecífica, se muerden, adquieren la rabia, van a otro refugio y retrasmiten la enfermedad, eliminan virus por saliva, antes de manifestar los síntomas, cuando los evidencian mueren a los pocos días.

Ciclos epidemiológicos

En Argentina se mantienen por dos ciclos (Figura 11.2):

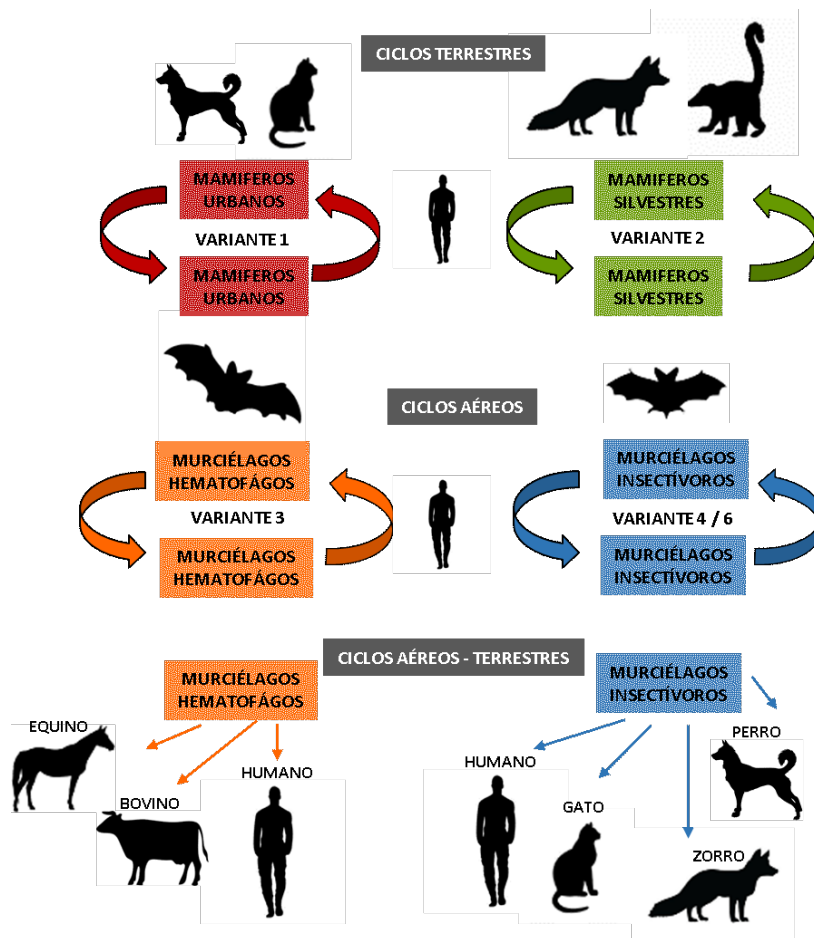
Ciclo urbano:

- Terrestre: (variante 1) principal reservorio: perro y gato. Poblaciones callejeras no vacunadas.
- Aéreo: (variantes 4,6 y otras) los reservorios son los murciélagos insectívoros.

Ciclo Rural:

- Terrestre:(variante 2) reservorios: perros y animales silvestres (zorros).
- Aéreo: (variantes 3,4,6 y otras), el vampiro es el reservorio de la variante 3 y los murciélagos del resto de las variantes aéreas.

Figura 11.2. Ciclos de rabia, Zoonosis – MSAL



Vacunas para Rabia pasesiante

- Vacuna en cultivo celular BHK, cepa viral ERA, con adyuvante de gel hidróxido de aluminio. También puede emplearse la cepa viral PV (virus Pasteur).

Antes de ser aplicada se deberá comprobar:

- Vigencia del producto, constatar la fecha de vencimiento del mismo.
- Conservación adecuada: entre 4-8°C, según Laboratorio Productor.
- Aplicación: vías y dosis respetando el Laboratorio Productor.

Plan de Control

El plan de control incluye la vigilancia epidemiológica, el combate del vampiro y la vacunación del ganado.

Vacunación: No es obligatoria, el costo económico sería mayor que las pérdidas por la enfermedad; la exigencia de la vacunación obligatoria no vale como estrategia, pues la rabia continúa con el vampiro; sólo se vacuna en el establecimiento del brote y sus linderos (ver control de foco); siempre se debe completar la planilla de brote (SENASA).

En áreas endémicas: Regímenes de Vacunaciones Especiales.

- **Vacunación emergencial obligatoria.** Es la vacunación que indica el veterinario oficial para todos los animales susceptibles a un brote de rabia pasesiante.
- **Vacunación antirrábica especial.** Dentro del área endémica existen establecimientos ganaderos que, por sus características, se sugiere que adopten un régimen de vacunación contra la rabia especial y constante (independientemente de que existan o no brotes de rabia), para evitar la interdicción si quedaran afectados a un brote de rabia. Dicha vacunación deberá ser registrada por el productor en la oficina local del SENASA y posteriormente el veterinario oficial deberá cargarla en el SUR: Ubicación - Ente geográfico –Nuevo (cargar los datos pedidos según sistema)- Confirmar.
- **Establecimiento con vacunación antirrábica voluntaria.** Los establecimientos involucrados en este tipo de vacunación (animales con alto valor económico y/o animales con alta tasa de movimientos), son los siguientes:
 - Establecimientos de engorde a corral, debiéndose vacunar al ingreso
 - Herbívoros utilizados para deportes (jineteadas, carreras, polo, salto, entre otros). En el caso de equinos, se debe considerar la obligatoriedad de la vacuna, en aquellos animales que son utilizados en eventos deportivos, pues circulan por distintas provincias, donde puede haber presencia de rabia pasesiante, en cabañas y haras, debe realizar antes de enviarlo a exposiciones o remates, dos dosis de vacuna, la 1^{ra} entre 80 y 60 días y la 2^{da} entre 50 y 30 días antes del traslado.
 - Las cabañas y haras. -Cualquier actividad productiva que el Senasa considere agregar al listado, por sus características.
- **Vacunación voluntaria.** Es la vacunación que el productor opta por aplicar, para proteger a su ganado, independientemente de que el mismo esté dentro de un brote de rabia pasesiante.

Respuesta Inmune

Esta respuesta es humoral, con producción de anticuerpos neutralizantes fundamentalmente contra la Glicoproteína (G).

La duración de la respuesta inmune, considerando el valor antigénico de la vacuna, dependerá de lo expuesto por el laboratorio productor en las indicaciones, la revacunación anual o período mayor, fue determinado por pruebas de seguimiento y validación, que así lo acreditaron.

Control de Foco

Foco de rabia: es el escenario urbano y silvestre, con presencia de 1 ó más casos.

Foco notificado: es el foco identificado, registrado e informado a la autoridad competente.

Foco investigado: es sobre el que se ha hecho la investigación epidemiológica.

Foco controlado: luego de intervenido no ha presentado nuevos casos.

Focos en Rabia Paresiente: se recomienda vacunar todos los animales susceptibles del establecimiento en brote y su lindero en un radio de 10km, caninos, felinos y animales en producción (SENASA).

Al efectuar el control, hacer tareas de seguimiento y vacunación considerando la dimensión espacial, que depende de la especie que originó el foco: 200m a la redonda si se originó por murciélago frugívoro, 10 km si se trata de hematófago, 500 m en el caso de gato, en perros 500m en un animal estable o determinando, si es vagabundo, con un corredor de 100m a cada lado del trayecto.

En el Brote

¿Cómo se debe actuar para poder tomar las medidas cuarentenarias?

Los establecimientos son interdictados, para evitar la faena y consumo; en cada lugar se procederá a extraer material de un animal sospechoso o con sintomatología de rabia, para enviar al laboratorio de diagnóstico, **las muestras sólo deben ser extraídas por el Médico Veterinario o paratécnico acreditado para tal fin**, se remitirán las muestras en frasco hermético o bolsa, sin agregado de ningún tipo de sustancia, correctamente rotulado, se mantendrá refrigerado y se enviará, perfectamente cerrado y sellado.

Se mantienen medidas de restricción sobre los animales, por un periodo de 30 días después de la vacunación.

Se deben incinerar los cadáveres o enterrarlos, de no ser posible completo, se debe realizar la incineración de la cabeza.

Si hubo contacto por parte del personal, con los animales sospechosos, tomar las medidas sanitarias correspondientes para la protección del personal.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico presuntivo se basa principalmente en la presencia del vampiro y sus ataques, como se sabe, la rabia es multiespecífica (con respecto a los huéspedes), teniendo conocimiento de esto, se debe realizar en el laboratorio, el diagnóstico diferencial con botulismo en el bovino o encefalitis en el equino, ya que ambas se presentan con sintomatología nerviosa.

Referencias bibliográficas

- Acha, P. y Zifres, B. (1989). OPS. Publicación científica N°503. 2^{da}Ed. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.
- Delpietro, H. y Russo, G. (2009). Acquired resistance to saliva anticoagulants by prey previously fed upon by vampire bats (*Desmodus rotundus*): Evidence for Immune Response. J. Mammalogy 90(5).1132-1138.
- Delpietro, H. y Russo, G. (2011). Manual de Procedimientos en Rabia Paresiante. 1^a ed. Buenos Aires
- La importancia de prevenir la Rabia Paresiante. (2005). Revista Electrónica de Veterinaria: RED-VET. ISSN1695-7504. Vol. VI N°10.
- Manual de Normas y procedimientos para la vigilancia y control de la rabia. (2007). Ministerio de salud. Presidencia de la Nación. República Argentina.
- Manual de procedimientos Rabia Paresiante. (2004). Dirección de Lucha Sanitaria. Dirección Nacional de Sanidad Animal. N°8.
- Manual de Procedimientos. Rabia Paresiante. Edición 2022. SENASA
- Manual OIE sobre animales terrestres. (2004). Cap. 2.1.13. Rabia.
- Normas y Recomendaciones Nacionales para la Vigilancia, Prevención y Control de la Rabia en Argentina. (2015). Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.
- Simposio Argentino sobre Rabia. (2016) Rabia: una enfermedad vigente. 30 de junio y 1 de julio de. Fundación Pablo Cassará. Buenos Aires.

CAPÍTULO 12

Vacuna contra Diarrea Viral Bovina

Gabriel Eduardo Traveria

Introducción

El agente causal conocido como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) pertenece al género *Pestivirus* familia *Flaviviridae*, el material genético se compone de una cadena de ARN simple positiva. El genoma viral codifica para proteínas estructurales y no estructurales, las proteínas estructurales core, E^{ms}, E1 y E2, y las siguientes proteínas no estructurales: N^{pro}, NS2, NS3 (P80), NS4a/b y NS5a/b. Las subunidades más estudiadas para las vacunas son la glicoproteína mayor de envoltura E2 y la proteína no estructural NS3. La enfermedad se describió en 1946. Se conocen dos genotipos del virus, el genotipo tipo 1 dividido en 12 subgenotipos y el genotipo tipo 2 dividido en dos subgenotipos, además basado en el efecto citopático sobre los cultivos celulares se clasifica en cepas citopáticas (cp) y no citopáticas (ncp). La enfermedad presenta manifestaciones variadas, puede comprometer uno o varios órganos con consecuencias respiratorias, entéricas, reproductivas, un síndrome severo llamado enfermedad de las mucosas, enfermedad subclínica, persistencia viral, trombocitopenia, enfermedad clínica moderada con linfopenia y consecuencias asociadas a infecciones bacterianas secundarias relacionadas a una respuesta inmune alterada, como la enfermedad respiratoria bovina (ERB). El VDVB afecta una serie de células con predilección por las células del sistema inmune, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Como resultado las células pueden morir o tener efectos más sutiles como modificaciones en la expresión de citoquinas y moléculas de co-estímulo. Las alteraciones en las células inmunes y no inmunes afectan la inmunidad innata y adquirida. Los animales que tienen persistencia viral se conocen como persistentemente infectados y actúan como reservorio del virus.

Presentaciones de la enfermedad:

- Infecciones transitorias agudas (forma inaparente)
- Respiratoria sin complicaciones o asociada a otros agentes (ERB)
- Digestiva enfermedad aguda o con co-infecciones
- Forma hemorrágica/trombocitopenia
- Enfermedad de las mucosas
- Tracto reproductivo y fetal
- Persistentemente infectado (PI)

El virus codifica cuatro proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales, la respuesta de anticuerpos dirigidos contra la proteína estructural E2 bloquea el ingreso del virus a la célula. La respuesta celular se encuentra dirigida contra E2 y las proteínas no estructurales expresadas en las células infectadas. La respuesta celular incluye la activación de LT citotóxico CD8 + y las células T gamma delta $\gamma\delta$ T.

Patogenia

El virus ingresa por aerosoles o vía fecal-oral infectando las células epiteliales de la cavidad oral, el tracto respiratorio o digestivo diseminándose a las células del tejido linfoide adyacente a las mucosas incluyendo las placas de Peyer y los linfonodos de drenaje. También se produce una viremia comprometiendo el tejido linfático y células hematopoyéticas generando una inmunosupresión permitiendo la infección fetal y la generación del persistentemente infectado de particular importancia en la diseminación del virus en el rodeo. El virus se disemina por fluidos corporales como orina, lágrima, leche, saliva, semen, descargas nasales y uterinas, la materia fecal presenta baja carga viral. Los animales persistentemente infectados son la principal fuente de diseminación del virus. Una vez infectados los animales presentan una viremia transitoria de 10-14 días asociada a linfopenia, leucopenia, trombocitopenia, apoptosis del timo, inmunosupresión, pirexia y diarrea. La inmunosupresión se asocia al complejo de la enfermedad respiratoria y al aborto asociado a otros patógenos como *Neospora caninum*. En algunos casos agudos, la diarrea se asocia a la infección de los ganglios nerviosos mientéricos. La infección de la madre entre los 45 días de gestación y hasta los 150 días puede resultar en terneros persistentemente infectados, las infecciones entre los días 80 y 150 de gestación pueden inducir efectos teratogénicos en el feto. Uno de los principales objetivos de la vacunación es evitar la viremia y la diseminación sistémica evitando la aparición de signos clínicos protegiendo al feto y evitando el nacimiento de persistentemente infectados. Hay un interés particular en el desarrollo de la inmunidad de las mucosas para prevenir la infección, bloqueando el ingreso del virus a las células epiteliales de las mucosas en los animales jóvenes.

Preñez: la mortalidad embrionaria en los bovinos se produce en parte por la falta del reconocimiento embrionario. Las prostaglandinas son importantes en la implantación embrionaria, el virus de la VBDV altera el reconocimiento de la preñez, inhibiendo el efecto del interferón tau y en la producción uterina de la prostaglandina, induciendo un intercambio en la producción de PGF2 por PGE2, disminuyendo la inmunidad uterina, predisponiendo a la aparición de enfermedades.

Infecciones crónicas: La infección fetal en los primeros meses de vida es la principal fuente de animales persistentemente infectados, sin embargo los animales que sufren infecciones sistémicas transitorias pueden padecer de infecciones crónicas cuando el virus se localiza en lugares inmunológicamente privilegiados como son los folículos ováricos, los tubos seminíferos en el tejido testicular, tejidos del sistema nervioso central, y células sanguíneas blancas circulantes. Los animales persistentemente infectados no generan anticuerpos contra la cepa de origen, en contraste con los

animales que presentan infecciones crónicas en algunos sitios inmunológicamente privilegiados, los cuales reconocen la cepa como extraña y generan anticuerpos con títulos altos.

Mecanismos de respuesta inmune

Inmunidad Innata

El virus tiene tropismo por los macrófagos/monocitos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos alterando sus funciones durante un período de 15 días. En los fetos: Los macrófagos infectados con las cepas ncp no pueden producir interferones tipo I, los macrófagos infectados con las cepas cp sí producen interferón I. Las cepas citopáticas presentan una mayor cantidad de ARN de doble cadena, un patrón molecular asociado a los patógenos estimulantes del interferón tipo I por parte de los receptores de reconocimiento de patrones RIG-I y los receptores tipo toll 3 (TLR3). Además la glicoproteína E RNasa (E^{ms}) degrada el ARN extracelular de simple y doble cadena un agonista del interferón tipo I, evitando de esta forma su activación. La glicoproteína E^{pro} tiene la propiedad de degradar el proteasoma bloqueando al interferón tipo I. La actividad combinada de las glicoproteínas E^{ms} y E^{pro} es necesaria para el establecimiento de un animal persistentemente infectado (PI).

Inmunidad adaptativa

La mayoría de las cepas de BVDV son ncp, estas cepas a diferencia de las cp activan más rápido la inmunidad humoral, presentan un mayor tropismo por el tejido linfático asociado a la mucosa y los antígenos persisten por períodos más prolongados. Las cepas cp y ncp infectan a las células dendríticas y monocitos generando progenie de virus, las cepas cp lisan a los monocitos. Las células presentadoras de antígeno infectadas con cepas ncp tienen disminuidos los receptores Fc (receptores para la fracción cristalizable de los anticuerpos) y el receptor C3 (receptor para el complemento) reduciendo la capacidad fagocítica de las células presentadoras de antígeno. La linfopenia afecta a los linfocitos TCD8⁺ y a los CD4⁺, la infección aguda con cnp puede disminuir la expresión de IFN gamma en los linfocitos TCD4 Th1, afectando la inmunidad celular alterando la detección de los animales infectados con *Mycobacterium bovis*. En las infecciones agudas las cepas virulentas de BVDV producen depleción de linfocitos B en las regiones foliculares de los linfonódulos y en las placas de Peyer del intestino. La respuesta humoral se encuentra principalmente dirigida contra la glicoproteína inmunodominante E2, los anticuerpos generados son neutralizantes.

Vacunas contra VDVB

Las vacunas inactivas presentan como ventaja evitar los problemas asociados a las vacunas activas, como la inmunosupresión, la generación de persistentemente infectados y la aparición de

virus contaminantes asociados a las vacunas activas, para ser efectivas requieren de una concentración antigénica equivalente a 10^7 TCID/ml (partículas virales: dosis infectante de cultivos de tejido). Como contraparte, las vacunas inactivas presentan una respuesta inmune humoral limitada a la proteína estructural E2, requieren de adyuvantes, vacunaciones múltiples y los títulos de anticuerpo disminuyen a los pocos meses. Las vacunas activas presentan como ventajas la generación de inmunidad humoral y celular, con una cobertura de mayor duración al aplicar una sola dosis. Las respuestas se encuentran dirigidas contra las proteínas estructurales como la E2 y las no estructurales expresadas en las células infectadas, las proteínas no estructurales no solo son claves en la replicación viral, sino que además son altamente conservadas entre las distintas cepas y biotipos, confiriendo protección cruzada.

Especies y subespecies de cepas vacunales: Activas: Singer CP 1a, NADL CP 1a, 5912 CP 2a, C24 V CP 1a. Inactivas: Singer CP 1a, 5912 CP 2a,

Respuesta inmune vacunal

Cuando se vacuna a virus activo con una dosis se detectan anticuerpos a los 14 días post vacunación. En las vacunas inactivas cuando se los vacuna con una dosis, sólo algunos animales responden con anticuerpos a los 14 días. Con una segunda vacunación la respuesta se incrementa en forma significativa con ambas vacunas en los días 35 y 42 post vacunación. La declinación de los anticuerpos en ambas vacunas se observa desde el día 42 a 142.

Con los estudios de metaanálisis (recopilación de información publicada) la protección conferida por las vacunas multivalentes es mejor que las monovalentes, los virus activos son mejores que las vacunas inactivadas para reducir los problemas reproductivos. Las vacunas inactivadas se deben administrar preferentemente en animales no preñados. Las vacunas inactivadas presentan una protección aceptable frente a la infección fetal y el aborto.

Uso estratégico de las vacunas

Uno de los principales objetivos de la vacunación es la protección fetal para evitar animales persistentemente infectados y mejorar la eficiencia reproductiva, otro objetivo es evitar las pérdidas que genera la presencia de los signos clínicos. Prevenir la infección fetal requiere evitar la replicación viral, y por ende es más exigente que evitar la presencia de signos clínicos.

Vacunación en presencia de anticuerpos calostrales

Los terneros son muy susceptibles a BVDV y suele ser difícil determinar cuando los anticuerpos calostrales dejan de proteger a los terneros, por esta razón hay interés en vacunar a los terneros

antes de que los anticuerpos calostrales desaparezcan. Normalmente la presencia de anticuerpos calostrales dificulta la inducción de inmunidad activa artificial (vacunal). Tomando en cuenta que los terneros tienen una inmunidad de mucosa funcional, una alternativa son las vacunas intranasales en donde inoculando terneros de 7 días de edad con vacunas atenuadas se detectan cantidades significantes de IgA en las secreciones nasales 10 días posteriores a la vacunación, con una segunda vacunación a las 5 semanas se produce una respuesta anamnésica fuerte de anticuerpos, en las secreciones nasales. La estrategia de vacunación sería combinar vacunas activas intranasales en los terneros, asegurando inmunidad activa antes de que los anticuerpos calostrales lleguen a niveles críticos con la inducción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes en las madres preñadas.

Estos objetivos se logran vacunando los animales antes del servicio y a las vaquillonas en el momento de la selección, unos meses previos al entore. El uso de vacunas activas en estos momentos genera suficiente cobertura vacunal durante el periodo de gestación, para la producción de calostro con anticuerpos neutralizantes. Otra oportunidad de vacunación es durante la primera mitad de la gestación cuando se realiza la confirmación de la preñez mediante el tacto rectal, pero la presencia del concepto requiere del uso de una vacuna con máxima seguridad como las vacunas inactivadas.

Efectos adversos de vacunas inactivadas

Cuando la vacuna se cultiva en células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) los neonatos pueden sufrir de una pancitopenia severa neonatal (disminución de los glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas). Una enfermedad descrita por primera vez en el año 2006, en Alemania, causado por el consumo de calostro conteniendo anticuerpos aloreactivos (respuesta de anticuerpos no propios pero pertenecientes a una misma especie), presumiblemente generados por vacunas de BVDV. Los terneros, al mamar el calostro, conteniendo aloanticuerpos, padecen de hemorragias e inmunosupresión.

Efectos adversos de las vacunas activas

Aparición de enfermedad de las mucosas post vacunal, solo se da cuando se vacuna con una cepa citopática a virus activo modificado un animal persistentemente infectado, por lo tanto los persistentemente infectados no se deben vacunar con vacunas activas. La vacunación con virus activo puede inducir una inmunosupresión transitoria ya que infecta los neutrófilos, monocitos y macrófagos.

Programas de control

Se basan en las medidas de bioseguridad, detección y eliminación de los persistentemente infectados y en programas de vacunación para evitar la diseminación de virus (persistentemente infectados) y la presencia de signos clínicos.

Vacunas disponibles en Argentina

Las vacunas aprobadas por SENASA en Argentina son todas inactivas, se recomienda una carga viral mínima de 10^7 TCID₅₀/ml, algunos laboratorios ofrecen una carga viral de $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml, otros laboratorios ofrecen vacunas recombinantes utilizando la glicoproteína E2 unida a una cadena simple de anticuerpo denominada APCH (APCH: *Antigen Presenting Cell Heavy chain*) esta cadena simple de anticuerpo está dirigida contra el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II de las células presentadoras de antígeno. De esta forma, el complejo molecular busca asegurar el ingreso de la glicoproteína E2 a la célula presentadora de antígeno debido a que la cadena simple del anticuerpo tiene como ligando al receptor CMH tipo II de la célula presentadora de antígeno.

Referencias bibliográficas

- Bellido, D., Gumina, E.R., Rodríguez Senes, G.J., Chiariotti, F.M., Audrito, M., Sueldo, P.M., Sueldo, G.M. y Wigdorovitz A. (2024). First evaluation of the impact of a targeted subunit vaccine against bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. *Transl Anim Sci.* 2024 Apr 6;8:txae046.
- Chi, S., Chen, S., Jia, W., He, Y., Ren, L. y Wang, X. (2022). Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus. *Virus Genes.* 2022 Dec;58(6):491-500.
- Fulton R.W. (2015). Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhea virus on control by vaccination. *Anim Health Res Rev.* 2015 Jun;16(1):40-54.

CAPÍTULO 13

Vacuna contra Rinotraqueitis infecciosa bovina

Gabriel Eduardo Traveria

Introducción

La rinotraqueítis infecciosa bovina es provocado por el herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1), es un virus ADN de cadena doble, envuelto con espículas glicoprotéicas antigénicas, género *Vari-cellovirus*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, el rango de hospedadores son principalmente los bovinos, a los cuales una vez que infecta, se caracteriza por generar latencia, también puede infectar a las cabras, los lanares, los camélidos y los búfalos. Mediante los análisis genéticos, el BHV-1 se puede dividir en subtipos: BHV-1.1, relacionado al síndrome respiratorio; BHV-1.2, relacionado a infecciones genitales y el BHV-1.3/BHV-5, que afecta al sistema nervioso central. Todos los subtipos se encuentran antigénicamente relacionados. El virus se transmite por descargas nasales durante 10-14 días después de una infección aguda del aparato respiratorio y por diseminación al reactivarse el virus que se encuentra en latencia en las células nerviosas de los ganglios nerviosos, bajo condiciones estresantes el virus se reactiva de la latencia y produce enfermedad.

Presentaciones de la enfermedad

- Abortos y problemas reproductivos
- Conjuntivitis
- Enfermedades respiratorias, enfermedad respiratoria bovina (ERB)
- Enfermedades del sistema nervioso central (SNC)
- Inmunosupresión

Transmisión

Se transmite por aerosoles y contacto directo, el virus ingresa por la cavidad nasal orofaringe, vía ocular y genital. Normalmente hay una primera ronda de replicación en las células epiteliales del lugar de entrada. Los signos clínicos se asocian a la destrucción de las células provocadas

por la replicación viral, con títulos virales altos y en coincidencia con el momento de mayor diseminación. Durante estos episodios, la lisis de las células infectadas generan condiciones que propician las infecciones bacterianas secundarias, potenciando las lesiones y sus consecuencias. El virus puede permanecer restringido localmente o diseminarse por viremia y por vía neuronal a los ganglios sensoriales regionales. En algunos casos el virus queda restringido localmente al tracto respiratorio, en la conjuntiva dando conjuntivitis o en el tracto genital ocasionando balanopostitis y vulvovaginitis. La diseminación mediante viremia no se encuentra totalmente comprobada, pero se conoce que el virus puede infectar los monocitos sanguíneos y puede absorberse a los linfocitos actuando como vehículos virales, esta diseminación le otorga al virus la capacidad de infectar otros órganos, el efecto más conocido serían los abortos producidos por BHV-1. Después de una infección respiratoria, el virus se replica en los monocitos y se multiplica en las células del placentoma, a consecuencia de las lesiones que se encuentran en el hígado fetal se supone que llega al feto vía hematógica por la vena umbilical.

Diseminación vía axonal

Durante la replicación inicial, el virus puede acceder a los axones de las células nerviosas locales, mediante el transporte intra-axonal, llegando a las células neuronales de los ganglios nerviosos regionales en donde permanece en latencia. El virus BHV-5 puede replicarse en las células gliales y ganglionares invadiendo el sistema nervioso central provocando encefalitis.

Factores de virulencia

Las glicoproteínas de la envoltura son las responsables de la adsorción viral a los receptores celulares, ingreso, egreso y diseminación célula-célula. La glicoproteína D es importante en las etapas iniciales del ingreso viral. En la fase replicativa, se puede demostrar en la superficie de las células la presencia de antígenos virales y la generación de nuevas partículas virales, con el consiguiente estímulo del sistema inmune, dando una respuesta inmune humoral y celular.

Latencia

Como cualquier virus herpes, el BHV-1 puede establecer infecciones latentes. La latencia se establece, cuando no se puede demostrar la presencia de partículas o antígenos virales en las células que se encuentran infectadas en forma latente, pero sí se puede demostrar el ADN viral en el núcleo de las células de los ganglios nerviosos sensoriales. De esta manera se genera un reservorio incapaz de ser detectado por el sistema inmune del hospedador. Mediante una reactivación posterior, pasa de la fase de latencia a la fase replicativa, las partículas virales pueden

diseminarse nuevamente a un hospedador susceptible. Para que se produzca la latencia se deben dar algunas condiciones, la latencia se presenta en las células que posean una vida prolongada y no replicativa como es el caso de las neuronas; y además estas células no deben ser destruidas ni deben sufrir apoptosis. El BHV puede evitar la apoptosis de las células. Es importante que durante el período de latencia la célula no sintetice proteínas virales capaces de ser detectadas por el sistema inmune. Para que no se produzcan proteínas virales, la replicación viral productiva se debe interrumpir en los estados iniciales. Otro sitio en donde se puede inducir la latencia es en el tejido linfoepitelial de las tonsilas, tanto para BHV-1 como para BHV-5.

Reactivación de la latencia

Entre los estímulos más conocidos que llevan a la interrupción de la latencia, se mencionan a los factores estresantes, el tratamiento con corticoesteroides y el parto. Una vez iniciada la reactivación, a partir de la latencia, las nuevas partículas virales son transportadas en el interior de los axones neuronales a la periferia en dirección retrógrada, de esta manera llegan a la puerta de entrada original. En este momento, el sistema inmune puede prevenir la diseminación viral si la respuesta es lo suficientemente adecuada, por el contrario, si por el tiempo transcurrido durante la latencia, la respuesta del sistema inmune es débil, el virus se diseminará a otro hospedador susceptible. En este estadio hay una oportunidad de intervenir en la diseminación de la enfermedad, mediante el estímulo inmune otorgado previamente con las vacunas.

Mecanismo de respuesta inmune

Después de la infección se genera una importante respuesta humoral. Al principio se da una respuesta por anticuerpos neutralizantes IgM, seguida de IgG y IgA en las secreciones mucosas. Los anticuerpos que se unen al virus libre son importantes para evitar la infección por su acción neutralizante, también podrían intervenir en la lisis celular al actuar como opsonina para el complemento y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, pero para la recuperación de la enfermedad se requiere de la inmunidad celular.

La primera acción de la respuesta inmune es evitar la interacción del virus con la célula permissivas a la infección, en una respuesta primaria no hay anticuerpos que puedan impedir la infección de las células, posteriormente los anticuerpos tampoco pueden evitar la diseminación célula-célula, con la aparición de los anticuerpos, se neutralizan los virus evitando la infección y mediante la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, junto con los neutrófilos provocando la lisis de las células infectadas con BHV-1.

Vacunas

Desde el primer aislamiento del BHV-1 en 1956, se comenzaron a utilizar vacunas activas e inactivas. Más tarde se incorporaron las vacunas a subunidades y las marcadoras. Las vacunas activas se obtienen pasando en forma sucesiva el virus por líneas celulares. Entre las vacunas activas, se encuentra la cepa RLB 106 sensible a la temperatura sometida al ácido nitroso. Las vacunas activas se han utilizado por vía intramuscular o intranasal.

Inmunógeno esenciales

La glicoproteína D es un antígeno de la envoltura viral, cumple funciones en el ingreso viral a la célula hospedadora, es uno de los principales componentes de las vacunas por su habilidad para estimular la respuesta inmune humoral y celular.

Vacunas activas

Se dispone de tres tipos de vacunas activas: las que se aplican por vía parenteral, proveniente de células de riñón fetal bovino; vacunas intranasales, provenientes de pasajes en células de conejo; y la tercera proviene de células de origen bovino conteniendo una cepa mutante termosensible (ts), administrada por la vía intranasal. Pasando las cepas virales por pasajes en líneas celulares heterólogas, se producen delecciones o mutaciones. Las cepas virales así generadas, una vez inoculadas, se multiplican en las células del hospedador y son presentadas por el CMH-I y CMH-II, generando linfocitos T citotóxicos e inmunidad humoral, dando respuestas rápidas y duraderas. Las vacunas intranasales dan una respuesta rápida a las 72 horas después de su aplicación, se pueden inocular en animales preñados, inducen una respuesta inmune en terneros a partir de los 7 días de vida, dejan memoria inmune ante un desafío posterior y tienen una duración aproximada de 6 meses. La dosis de aplicación de 2 ml se debe realizar en forma cuidadosa ya que solamente se multiplican en la cavidad nasal. Las cepas vacunales se pueden diferenciar de las cepas salvajes por enzimas de restricción, su aplicación no se debe realizar en animales preñados seronegativos, porque son potencialmente abortigénicas, en especial las indicadas para su aplicación intramuscular, también pueden producir latencia y posteriormente diseminarse ante una reactivación. En cambio, las vacunas activas termosensibles indicadas para su inoculación por la vía intranasal no son abortigénicas, debido a que, por su carácter de mutante termosensible, el virus solo puede multiplicarse en los lugares de baja temperatura y, por lo tanto, no puede multiplicarse en forma sistémica por la temperatura corporal sistémica. Las intranasales protegen a partir de las 72 hs de aplicadas por la protección conferida por los interferones locales, son aptas para aplicarse durante un brote de enfermedad respiratoria, por la rápida respuesta generada.

Vacunas intranasal en terneros

El uso de vacunas en la mucosa de los terneros presenta como ventaja una mayor probabilidad de inducir una respuesta inmune primaria en presencia de anticuerpos calostrales cuando se las compara con las inoculaciones parenterales. Como ventaja adicional, el uso de vacunas activas modificadas aplicadas en la mucosa no se limitan a reducir el efecto de la enfermedad, sino que presentan altas probabilidades de evitar la infección en los virus que infectan y se multiplican en las células epiteliales de las mucosas, como en el caso de BHV-1, el virus de la parainfluenza 3 (PI-3) y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV).

Vacunas inactivadas

Suplen las desventajas que generan las vacunas activas, no causan inmunosupresión, aborto, ni latencia, además son más estables en su conservación. Como desventajas no son tan protectoras como las activas, requieren de adyuvantes, de dos aplicaciones con intervalos de 14 días y la protección se logra pasados 10 días de la segunda aplicación.

Vacunas a subunidades

Contienen uno o más antígenos necesarios para generar una respuesta inmunitaria protectora y desprovistas de otros componentes que pudieran generar efectos adversos. En el caso de BHV-1 se separan las glicoproteínas protectoras gB, gC y gD o se sintetizan. La inmunidad generada es humoral, cuando se inoculan como vacunas de plásmidos de ADN codificando las glicoproteínas mencionadas se estimula una respuesta Th1 dando como resultado una respuesta de inmunidad celular.

Vacunas marcadoras

Se basan en los cambios de una o más proteínas microbianas que permiten diferenciarlas de las cepas de campo.

Objetivos de la vacunación

Evitando la infección se evita la latencia/recrudescencia y la dispersión del virus. Este propósito es un logro que en la práctica es dificultoso. Se vacunan los animales en condiciones estresantes provocadas por el hacinamiento, el encierro, etc. El objetivo es controlar los animales seronegativos con infección los cuales pueden diseminar el virus después de sufrir estrés, los

animales jóvenes pueden adquirir la infección incluso en presencia de los anticuerpos calostrales, el virus entra en latencia y el animal permanece seronegativo.

La respuesta humoral a BoHV-1 es mayor en las vacunas a virus activo que inactivo y mejor en las intramusculares que en las intranasales. Algunas vacunas de BoHV-1 utilizan adenovirus humanos tipo 3 y 5, expresando glicoproteínas de BHV-1 gC o gD induciendo buenos títulos de anticuerpos neutralizantes al aplicarlos por vía intranasal se mimetiza la vía de ingreso natural del virus con la presentación antigénica que normalmente utiliza el virus.

Control

El control se basa en evitar el ingreso de animales enfermos, medidas de bioseguridad y vacunación.

Las vacunas activas modificadas, inoculadas por vía intranasal o intramuscular protegen a partir de las 40-96 hs de su aplicación, por la producción de interferones locales. Además, las vacunas intranasales producen inmunidad de mucosa, caracterizada por inducir inmunoglobulina A y una respuesta inmune mediada por células.

Las vacunas inactivas no causan abortos, no generan inmunosupresión ni producen latencia. Dan respuesta principalmente humoral de corta duración, requieren de adyuvantes y de dos aplicaciones separadas por 10 a 15 días, la protección se logra unos 14 días después de la segunda aplicación.

Vacunas disponibles en Argentina

Las vacunas aprobadas por SENASA son todas inactivas, se recomienda una carga viral de 10^7 TCID₅₀/ml.

Referencias bibliográficas

- Righi, C., Franzoni, G., Feliziani, F., Jones, C., y Petrini, S. (2023). The Cell-Mediated Immune Response against *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1) Infection and Vaccination. *Vaccines*, 11(4), 785. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040785>
- Petrini, S. y Maple, P. (2022). Herpesvirus Vaccines. *Vaccines* (Basel). 2022 Apr 18;10(4):628.
- Chase, C.C.L., Fulton, R.W., O'Toole, D., Gillette, B., Daly, R.F., Perry, G. y Clement T. (2017). Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Vet Microbiol.*;206:69-77.

CAPÍTULO 14

Vacuna contra el Ectima Contagioso ovino

Eduardo Mortola y Emilio Raul Iza

Introducción

El ectima contagioso (EC), también conocido como boquera, boca costrosa y dermatitis pustular contagiosa; es una enfermedad cutánea viral, zoonótica y altamente contagiosa que afecta a las ovejas, las cabras y algunos otros rumiantes domésticos y silvestres. Causa aftas y ampollas en los labios, morro, orejas y/o párpados. Los humanos también pueden verse afectados a través del contacto con animales infectados.

El EC es una enfermedad endémica que en campos contaminados se puede manifestar todos los años. La morbilidad ronda el 20% y la mortalidad es baja entre el 1 y el 3%. Esta enfermedad es autolimitante, resolviéndose de forma espontánea usualmente en un periodo de 1-2 meses. Aunque se considera una enfermedad relativamente benigna, desde el punto de vista económico puede causar importantes pérdidas. En la Argentina son escasos los trabajos que han podido confirmar el diagnóstico de esta enfermedad. La mayoría de las infecciones en los seres humanos son localizadas y se curan espontáneamente; no obstante, puede producir lesiones con cicatrización deficiente en pacientes inmunosuprimidos.

Agente etiológico

El EC es ocasionado por el Orf virus (Orfv). Descripto por primera vez en 1971, pertenece al género *Parapoxvirus* de la familia *Poxviridae*. Orfv posee un ADN de doble cadena y un peso de 85- 90 MDa. Presenta una morfología oval con 200- 400 nm de ancho y un largo de 1.2-1.7 veces su ancho, una compleja cubierta externa y la presencia característica de un grueso filamento externo, ordenado en espiral. Los Poxvirus son catalogados como los virus animales de mayor tamaño, tanto así que pueden ser observados mediante microscopía óptica.

Transmisibilidad y patogenia de la enfermedad

El EC es una enfermedad altamente transmisible. El virus se encuentra presente en lesiones cutáneas y costras y se piensa que ingresa en la piel a través de cortes y abrasiones. Se puede transmitir por contacto directo o en fómites. Este virus es altamente resistente en el medio ambiente y se ha descubierto en costras secas después de 12 años. Si bien Orfv tiene afinidad por rumiantes domésticos, tales como ovinos y caprinos, se han reportado casos de infecciones naturales en otras especies como alpacas, camellos, renos, bueyes almizcleros, borregos muflores, ciervos y antílopes americanos. Asimismo, existen reportes, aunque poco frecuentes, en perros que se alimentaron de carcasas infectadas.

El período de incubación en las ovejas y cabras es de 2 a 3 días. Los primeros signos clínicos son las pápulas, las pústulas y las vesículas que se encuentran en los labios, la nariz, las orejas y/o los párpados y ocasionalmente en las patas o en la región perineal. También pueden producirse lesiones dentro de la boca, especialmente en los corderos jóvenes, y estos pueden transmitir el virus a la madre, lo que causa lesiones en la ubre y los pezones. Las lesiones cutáneas se convierten en costras marrones, gruesas y de rápido crecimiento sobre áreas de granulación, inflamación y ulceración. Las lesiones causadas por el EC son dolorosas y pueden provocar anorexia o incluso inanición. Las lesiones en las patas pueden causar cojera. Las infecciones sin complicaciones se resuelven en un plazo de 1 a 4 semanas. Pueden ocurrir infecciones bacterianas secundarias e infestaciones por larvas.

Potencial zoonótico

Orfv es una zoonosis viral emergente, con un número cada vez mayor de brotes reportados en todo el mundo. Es una enfermedad contagiosa que tiende a propagarse muy rápidamente entre el ganado y los cuidadores de animales. La mayoría de los casos de Orfv se reportan en agricultores, veterinarios y personal de zoológicos, mientras esquilan, sacrifican u otra maniobra de los animales afectados, es una enfermedad ocupacional. Aunque se describió su potencial zoonótico en 1879, el primer caso de la enfermedad en humanos se describió en 1934. Las lesiones en humanos suelen desarrollarse en los dedos, manos o antebrazos y son de naturaleza benigna. Las formas sistémicas de infección, como el eritema multiforme y la linfadenopatía generalizada, son muy raras. Los casos de transmisión de persona a persona no se han notificado hasta el momento. La infección generalmente es autolimitada, pero puede crear efectos más graves en personas inmunocomprometidas.

Diagnóstico

Generalmente las infecciones en animales se diagnostican de manera sintomática. Las pruebas diagnósticas, utilizadas con poca frecuencia, incluyen el aislamiento del virus y la serología. Se puede intentar el aislamiento del virus en una variedad de cultivos celulares o huevos embrionados, pero el Orfv se desarrolla lentamente y no siempre puede ser aislado. Las pruebas serológicas incluyen seroneutralización, inmunodifusión en gel de agar, fijación del complemento y aglutinación. A nivel experimental se han desarrollado pruebas ELISA y se puede confirmar el diagnóstico mediante análisis por PCR del ADN extraído de las costras de las lesiones, que proporciona la confirmación molecular del diagnóstico clínico.

Respuesta inmune

La inmunidad desarrollada contra el Orfv después de la infección natural no es completa, si bien los animales recuperados son resistentes a la infección, puede haber casos de reinfección con signos clínicos leves y de desaparición rápida. Hasta el momento no existe una comprensión clara o completa del mecanismo de la inmunidad protectora. Hay muchas discusiones sobre el tipo de inmunidad que juega un papel importante en la infección, muchos han sugerido que la inmunidad humoral no desempeña un papel importante en la protección y que el título de anticuerpos simplemente indica una infección previa. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que un isotipo específico (IgG2) desempeña un papel importante. Asimismo, la existencia de Linfocitos T CD4+ parecen desempeñar un papel crucial en el mantenimiento de la protección. Como en la mayoría de los poxvirus, el Orfv también codifica proteínas que son capaces de hacer frente a distintas respuestas inmunes inflamatorias y, por lo tanto, podrían ser responsables de la evasión inmune. Es interesante señalar que estas proteínas virales interfieren potencialmente con los mecanismos inmunitarios innatos tempranos, tales como los diferentes efectos de las citoquinas, y podrían facilitar la replicación en el sitio de entrada del virus y la posterior manifestación de lesiones.

La eficacia de las proteínas del virus para contrarrestar la respuesta inmune primaria del huésped sigue sin dilucidarse. Como ya se ha demostrado con el virus del mixoma en conejos, algunos mecanismos de evasión inmune están restringidos en su eficacia al huésped de preferencia, como parece ser el caso del factor inhibidor de crecimiento granulocito-macrófago del Orfv. Además, se han descrito otros genes potenciales de virulencia o evasión inmune del Orfv, incluyendo un gen de resistencia a interferón (IFNR) y un homólogo funcional del gen de la interleucina-10 (IL-10).

Dado que en los ovinos y caprinos los brotes de EC pueden ser masivos y con frecuencia conducen a enfermedades graves en animales jóvenes, existe una demanda de vacunas eficientes. Además, las poblaciones animales que están protegidas por la vacunación reducirían al mínimo el riesgo para la transmisión al hombre.

Después de la recuperación de la infección por Orfv, la inmunidad proyectiva es frágil y de corto plazo, lo que permite reinfecciones regulares de los rebaños afectados. Actualmente no se sabe si las propiedades inmuno evasivas de Orfv están implicadas en la incapacidad del huésped para montar una inmunidad sólida, duradera y específica. Por otra parte, se ha demostrado en ovejas que después de la recuperación de la infección por una cepa altamente virulenta, la reinfección es mucho más suave en comparación con los animales que han sido infectados con una cepa de Orfv adaptada al cultivo celular primero y luego una reinfección con la cepa viral altamente virulenta.

El conocimiento cada vez mayor de la organización del genoma de Orfv y la identificación de genes de virulencia facilita la selección de componentes de virus que inducen una respuesta inmune protectora. Aunque la Orfv contiene potenciales genes de evasión inmune, la cepa atenuada D1701 posee especialmente una variedad de propiedades inmunoestimulantes.

Vacunas

La producción de la primera vacuna viva atenuada basada en virus de cultivo celular desarrollada en 1981 fue un paso importante hacia la generación de vacunas más seguras, mejor definidas y producidas en cultivo de tejidos.

Existen vacunas comerciales para caprinos y ovinos que se han empleado satisfactoriamente en determinados contextos epidemiológicos. Son vacunas a virus vivo atenuado (básicamente extraídas de costras molidas o cepas de cultivos de tejidos). Estos productos siempre deben ser utilizados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, especificadas en las etiquetas y administradas por un profesional veterinario. En algunas ocasiones se realizan en forma de autovacunas recolectando material de los propios animales infectados. Al vacunar a un rebaño sano, se está introduciendo el virus al mismo y debe llevarse a cabo teniendo en consideración este hecho. La aparición de costras en el lugar de la aplicación de la vacuna después de 1 a 3 días indica que la vacuna desencadenó el proceso para desarrollar una respuesta inmune.

En Argentina solo se dispone de una vacuna para la protección contra infecciones de Orfv comercializada bajo el nombre comercial de “vacuna anti-ectima para ovinos y caprinos” del laboratorio Rosenbusch. Se trata de una vacuna a virus vivo atenuado, propagado en líneas celulares estables y liofilizadas. Además, contiene penicilina, estreptomycin y anfotericina B para evitar infecciones bacterianas secundarias a la aplicación por escarificación. Para su preparación es necesario homogeneizar correctamente el liofilizado junto al solvente, una vez preparada debe ser empleada dentro de las 24 horas.

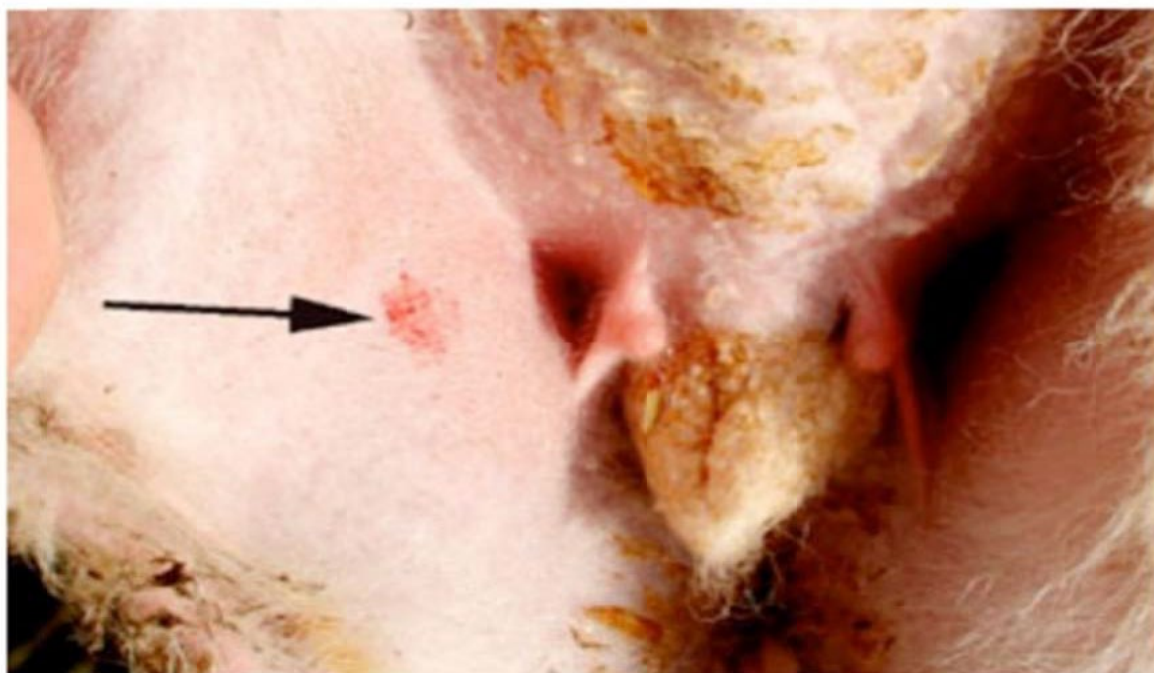
Los corderos deben vacunarse cuando tengan aproximadamente 1 mes de edad. Para obtener mejores resultados, se sugiere una segunda vacunación aproximadamente de 2 a 3 meses después. Los corderos no inmunizados deben vacunarse entre 1 y 2 meses antes de ingresar a los corrales de engorde infectados.

La vacunación es mediante escarificación, debiendo realizar un raspado en la cara interna del muslo (“verija”) evitando generar sangrado y aplicando una dosis de 0,1 ml (Figura 14.1). Al ser una vacuna viva, nunca se debe utilizar desinfectante para limpiar la zona. En caso de extrema suciedad se debe limpiar con un paño seco.

Si nunca se ha aplicado la vacuna antes, se recomienda realizar observación directa de la zona inoculada 15-20 días post aplicación y confirmar que exista una reacción similar a las lesiones de EC producidas naturalmente. En caso de vacunar a hembras con cordero al pie se sugiere vacunar en axila, debido a que, si se vacuna en “verija”, el cordero al mamar puede tener contacto con la zona vacunada y generar una infección en morro y boca. En la forma de aplicación de este tipo de vacuna, al modificar la vía de entrada del virus en la infección natural, se evita la manifestación clínica de la enfermedad, generando un estado de protección.

En nuestro medio, en algunas ocasiones se discontinúa la producción de la vacuna por parte del laboratorio productor, posiblemente debido a la baja demanda de este producto, en estos casos recurre al uso de la autovacuna.

Figura 14.1. *Vía de aplicación de la vacuna de Ectima contagioso ovino.*



Nota: Foto del laboratorio Rosenbusch

En hatos de cabras, es importante vacunar los animales como mínimo seis semanas antes de su comercialización para que las costras de la vacuna hayan desaparecido al momento de la venta. Luego de la vacunación se requieren de dos a tres semanas para que se instale una adecuada

protección. La vacuna se aplica en un área protegida, sin pelo, tales como el interior de la oreja, debajo de la cola y otros. Si bien no sería recomendable la aplicación a hembras preñadas, no se han reportado casos de abortos por vacunar animales preñados. Sin embargo, el estrés del movimiento de animales preñados a los corrales de manejo y de la propia vacunación podría potencialmente inducir el aborto en algunos animales. Los animales vacunados podrían proveer cierta inmunidad con el calostro a sus crías. Sin embargo, esta inmunidad es de corta duración y la vacunación debe orientarse en vacunar a todos los grupos de cabritos recién nacidos. En algunos programas, la revacunación anual de hembras en avanzada etapa de gestación se lleva a cabo junto con la vacunación del nuevo grupo de cabritos.

La desinfección de los corrales, luego de que hayan desaparecido todas las lesiones, es recomendable en el caso de que el dueño de un rebaño infectado escoja no seguir un programa rutinario de vacunación.

Prevención y control

En los primeros estadios del brote se recomienda aislar a los animales afectados y vacunar al resto. Vacunar únicamente en campos con presencia de la enfermedad. No se debe vacunar en establecimientos sin antecedentes y los animales vacunados deben separarse del ganado no protegido hasta que se hayan caído las costras.

Los inconvenientes de la vacuna, al ser viva, es que puede ocasionar la enfermedad si no se respeta la vía de inoculación y las indicaciones de aplicación. Asimismo, al ser transmisible al hombre, es importante prevenir el contagio con el uso de guantes en los operarios.

Para evitar el ingreso del EC a un rebaño no infectado, se debe poner en cuarentena a los animales nuevos. Se deben tomar precauciones para evitar la introducción del virus a través de fómites. Se deben retirar las plantas duras de las pasturas o del alimento para disminuir el riesgo de cortes en la boca o en el hocico.

La duración de la inmunidad vacunal es un tema controvertido; han ocurrido brotes en animales vacunados, pero el fracaso de la vacuna puede deberse a la virulencia de la cepa. El aislamiento de los animales puede ayudar a prevenir la propagación de la enfermedad. La erradicación del virus resulta difícil una vez que él mismo ha ingresado a un hato o rebaño.

Referencias bibliográficas

- Buller, R.M. y Palumbo, G.J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological reviews*. 55 (1): 80–122.
- Cargnelutti, J.F., Masuda, E., Martins, M., DieL, D., Rock, D., Weiblen, R. y Flores, E. (2011). Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microbial Pathogenesis*. 50 (1): 56–62.
- Duchateau, N.C., Aerts, O. y Lambert, J. (2014). Autoinoculation with Orfv. *International Journal of dermatology*, 53 (1): 60- 62.
- Elzein, E. y Housawi, F. (2009). Drastic cutaneous multi-focal Orf infection in goats, causing severe dysfunctioning. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 28 (3):1025–1029.
- Flores Olivares, C., Cantón, G., Peralta, A., Verna, A., Lischinsky, L., Spath, E. y Odeón, A. (2015). Confirmación molecular de un brote de Ectima Contagioso en ovinos del partido de Balcarce. 43º Jornadas uruguayas de Buiatria. Paysandú, 166–168 p.
- Fraser C.M. (2012). *El manual de veterinaria: un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario*. Merck & Company. Barcelona, España. 2671 p.
- García, L., Aceituno, O., López, F., Alonso, J. y García, A. (2012). El Ectima contagioso, una enfermedad infravalorada por el sector ovino y caprino. *Producción Animal* N° 275. 10 p.
- Haig, D., Thomson, J., McInnes, C., McCaughan, C., Imlach, W., Mercer, A. y Fleming, S. (2002). Orf virus immuno-modulation and the host immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87 (3): 395- 399.
- Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Scaliarini, A. y Singh, R. (2006). Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 116(4): 317–324.
- Lederman, ER., Tao, M., Reynolds, M.G., Li, Y., Zhao, H., Smith, S. y Damon, I. (2013). An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006. *Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects. Animals*. 3 (1): 142-157.
- Nandi, S., De, U. y Chowdhury, S. (2011). Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective. *Small Ruminant Research*, 96(2): 73-82.
- Tórtora, J. (1985). *Ectima contagioso en ovinos y caprinos*. Tesis Doctoral. Facultad Cuautitlán UNAM, México. 286 p.

CUARTA PARTE

Vacunas parasitarias

CAPÍTULO 15

Vacuna contra Hidatidosis

Mauro Joaquin Manfredi y Marcos Daniel Salina

Introducción

La Hidatidosis o también denominada Equinococosis quística (EQ); es una enfermedad parasitaria, zoonótica y cosmopolita que afecta ovinos, caprinos y, en menor medida, humanos (hospedadores intermediarios) al infectarse por ingestión accidental de alimentos contaminados con huevos del parásito *Echinococcus granulosus*, proveniente de heces de canidos infectados (hospedador definitivo).

Historia

Las primeras raíces etimológicas para describir la enfermedad se remontan a la época de Hipócrates, en el siglo IV a.C., el cual había descripto la infección como *echinoccoco* (derivado del griego *ekhino* – espinoso y *kokkos* – gusano) para explicar las pequeñas vejigas llenas de líquidos (o “tumores llenos de agua”) que se encontraban en la cavidad abdominal y órganos adyacentes en los enfermos. Areteo de Capadocia, en el s. I d.C, y posteriormente Galeno, en el s. II d.C, designan la palabra hidátide (del griego antiguo *hydatis* – “gota de agua” o “vesícula con agua”). En 1786, August Karl Batsch le asigna a la hidátide una identidad propia y pertenencia en el reino animal documentando los primeros hallazgos de quistes hidatídicos en el cerebro. En Argentina se documentaron los primeros casos de quistes hidatídicos en humanos entre 1870 y 1880, mientras que los primeros casos en ganado fueron publicados en 1875 por Julio Nicolas Creveaux al estudiar las lesiones en bueyes de quistes con una membrana fibrosa infiltrada de sales calcáreas y adheridas completamente al parénquima. Hoy en día, la Asociación Internacional de Hidatidosis pone principal énfasis al estudio del ciclo de vida del parásito y de las herramientas profilácticas y de control de zoonosis posterior al consumo de alimentos contaminados.

Agente etiológico

El principal agente etiológico de la formación de quistes hidatídicos es el cestodo *Echinococcus*, phylum: Platyhelminths; clase cestoda; orden *Cyclophyllidae*; familia taeniidae; género del que existen cuatro especies relevantes: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. Recientemente se han identificado otras dos, *E. shiquicus* y *E. filidis*, aislados respectivamente en pequeños mamíferos de la meseta tibetana y en leones africanos. Sin embargo, aún se desconoce su capacidad patógena. El estadio adulto mide aproximadamente 3-6 mm de longitud, y está conformado por una cabeza o escólex con 4 ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos que le permiten la fijación al intestino delgado, un cuello que une el escólex con el cuerpo o estróbilo formado por 3 a 5 proglótides inmaduro, maduro y grávido respectivamente.

En referencia exclusivamente a la especie *E. granulosus*, existe cierta evidencia que sugiere que algunos genotipos serían más virulentos para humanos, en comparación con otros. Este interesante fenómeno, propio de la biología del *E. granulosus*; se ha estudiado mediante técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis secuencial del ADN mitocondrial; permitiendo caracterizar a *E. granulosus* en sentido amplio, compuesto por:

- *E. granulosus* ss (*sensu stricto*):
 - G1: Relacionado con la infección de ovejas.
 - G2: También afecta a ovejas.
 - G3: Asociado con búfalos.
- *E. equinus*:
 - G4: Este genotipo toma el nombre de *E. equinus*.
- *E. ortleppi*
 - G5: Afecta al ganado bovino y toma el nombre de *E. ortleppi*.
- *E. canadensis*:
 - G6: Afecta a camellos.
 - G7 y G9: Afectan al ganado porcino.
 - G8: Afecta a ciervos.
 - G10: Afecta a renos

Distribución y epidemiología

La EQ se encuentra presente en todos los continentes según un reporte de 2011 de la OMS, sin embargo, los distintos genotipos se reportan con distribución geográfica variables entre ellos. Las cepas G1, G2, G5, G6 han sido reportadas en América Latina. Se considera una enfermedad endémica en gran parte del sur argentino, en relación a poblaciones que residen en zonas rura-

les, en especial en aquella con explotaciones extensivas de ovinos y caprinos, aunque el problema también se ha trasladado a zonas en procesos de urbanización. También se han descripto focos endémicos en provincias correspondientes al nordeste argentino (NEA) como el norte de Santa Fe, Corrientes y Entre Ríos, área de Pampa Húmeda (Buenos Aires, sur de Santa Fe y Córdoba), área Mediterránea (La Rioja, norte de San Luis y San Juan, sur de Catamarca y Santiago del Estero), área de Alta Montaña (Tucumán, Salta, Jujuy) y área cuyana (Mendoza y oeste de San Juan), representando un problema de Salud Pública y con grandes repercusiones económicas en producción.

Ciclo evolutivo

En cuanto a su ciclo biológico, *E. granulosus* presenta ciclo de vida heteroxeno el cual requiere dos hospedadores para completar su desarrollo; un hospedador definitivo (caninos, especialmente perros) y un hospedador intermediario (ovinos, caprinos, bovinos, porcinos y humanos). Una vez que el adulto se aloja en el intestino delgado de caninos se produce la eliminación de los proglótidos grávidos a través de la materia fecal y la liberación de huevos tipo “*tenía*” al ambiente. Los huevos están compuestos por una oncosfera o embrión hexacanto en su interior, esta estructura ciliada, esférica, y está provista de tres pares de ganchos; contenida en la envoltura embrionaria externa del huevo. Los hospedadores intermediarios ingieren los huevos y ya dentro del tracto digestivo se liberará la oncosfera, penetrando la mucosa intestinal y llegando a órganos de mayor actividad e irrigación por circulación sanguínea y/o linfática (principalmente pulmón e hígado y en menor medida corazón, riñón, cerebro) para comenzar su evolución a la forma quística larval. Esta forma quística, denominada *quiste hidatídico* se caracteriza por poseer una capa adventicia, una capa cuticular y una capa germinativa que da origen a las verdaderas formas infectantes denominadas protoescolex, que se encuentran en la vesícula madre, hijas y nietas conformando, junto con el líquido hidatídico, la denominada “*arenilla hidatídica*”. El ciclo biológico completo tiene una duración en torno a 4-7 semanas.

Patogenia y signos clínicos

Cabe destacar que los signos clínicos son pocos manifiestos, tanto en el hospedador definitivo como en los hospedadores intermediarios. En ovinos y caprinos se consideran hallazgos de quistes en rutina de faenas domiciliarias y en frigoríficos. En humanos, la enfermedad suele tener presentaciones clínicas como dolor en abdomen o pecho, astenia, dificultad para respirar, náuseas y/o tos cuando los quistes alojados en órganos son de un tamaño considerable (> 5 – 8 cm), o comprometen estructuras adyacentes. Entre las complicaciones

de la hidatidosis quística destaca, por una parte, la fistulización o ruptura del quiste, normalmente hacia las cavidades peritoneal o pleural. Esto puede dar lugar tanto a la diseminación de la infección a otros órganos como al desarrollo de reacciones anafilácticas.

Diagnóstico

En hospedadores intermediarios, los quistes hidatídicos pueden alojarse en hígado (70%), en pulmón (10 - 20 %) y entre un 5 y 15% en múltiples órganos. Alrededor del 40% de las infecciones cursan asintomáticas por lo que el diagnóstico consta de instancias clínicas y epidemiológicas. Las técnicas diagnósticas en casos sospechosos pueden ser por signos clínicos, técnicas serológicas (iElisa y Western Blot), técnicas complementarias (ecografías, radiologías, tomografías computarizada), examen microscópico del fluido o muestras histológicas compatibles y hallazgos quirúrgicos macroscópicamente compatibles. Para el control epidemiológico se realizan diagnósticos coproparasitológicos de flotación o sedimentación con el fin de detectar huevos en los hospedadores definitivos.

Respuesta inmunológica

Existen varias fuentes de estimulación antigénica en el hospedador con capacidad de producir una respuesta inmune: la exposición de oncosferas infectantes, el desarrollo de quistes inmaduros y el desarrollo de quistes fértiles (*quiste hidatídico*). La caracterización de proteínas en quistes hidatídicos es esencial para una mejor comprensión de la relación huésped-parásito. Los antígenos localizados en la capa germinal, en el líquido hidatídico y en los protoescolices pueden quedar en parte secuestrados dentro del quiste, cesando la estimulación para el hospedero (infección inactiva) o emerger a través de microfisuras de la capa laminar del quiste maduro produciendo respuesta inmune (infección activa). Los componentes inmunodominantes del quiste son las proteínas *EgTeg*, *Eg19* y *Eg95* importantes tanto en la respuesta inmune celular y humoral. La respuesta inmune de tipo celular se asocia a linfocitos Th1 y Th2 con liberación de interleucinas (IL4; 5; 6; 10; 12 y INF γ) como inmunomoduladores tanto a antígenos expresados por adultos del parásito en hospedadores definitivos, como en el desarrollo de quiste en hospedadores intermediarios. La respuesta inmune de tipo humoral se inicia con la producción de IgM, IgG (IgG₁ e IgG₄) e IgE, siendo esta última de gran importancia para la activación de macrófagos, eosinófilos y células cebadas con degranulación y fijación eosinofílica en la membrana del quiste.

Estudios a finales del siglo XX demostraron el principal interés por el antígeno Eg95 de *E. granulosus*. Las investigaciones sugieren que Eg95 es una familia multigénica y comprende siete isoformas (Eg95-1 a Eg95-7) caracterizada por ser altamente inmunogénica.

Vacuna recombinante eg95

Los primeros ensayos de candidatos vacúnales se situaron en la zona endémica más afectada por EQ en la provincia de Río Negro en 1996, con el objetivo de la producción de inmunidad de tipo humoral hacia estructuras previas a la formación del quiste. Se trata de una vacuna a subunidades a partir de una proteína recombinante de las glándulas de oncosferas parasitarias provenientes de una cepa de *E. granulosus* G1, utilizando como sistema de expresión de la proteína la *Escherichia coli*, posteriormente inactivadas y adyuvadas con saponina. Otros candidatos que se incluyeron en ensayos fueron a partir de antígenos crudos (proteínas maduras de protoescólex y líquido hidatídico); y vacunas a ADN (proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) y antígenos B), todas utilizadas con adyuvantes completos de Freund (CFA), incompleto de Freund (IFA), saponinas (Quil A) y sales de aluminio.

Inmunógeno principal

La estructura de EG95 comprende una proteína secretada con un anclaje de glicoproteínas y un dominio de fibronectina tipo III (Fn3), regulada durante la activación de la oncosfera y probablemente implicada en la adhesión a la superficie celular. El ADN que codifica para la proteína EG95 fue clonado y posteriormente expresado en *E. coli*. EG95 se expresa y queda retenida en el espacio periplásmico, por lo que es necesaria la ruptura bacteriana y la purificación por cromatografía. Una vez purificado el inmunógeno se formula con una concentración de 50 µg, con adyuvante oleoso (QuilA).

Protocolo de vacunación

Se recomienda su aplicación por vía subcutánea, aplicando dos dosis de 2ml con un intervalo de 15 a 21 días se puede inducir alrededor del 85 - 95% de eficacia de protección contra la infección durante 12 meses en ovinos con una transferencia de inmunidad significativa en el calostro que dura aproximadamente 3 a 4/5 meses en corderos.

Prevención y control

Las medidas para la prevención de la Hidatidosis se basan principalmente en el control de faenas domiciliarias, las cuales deben disponer de pozos sanitarios para el descarte de vísceras crudas, evitando que las mismas sean ingeridas por hospedadores definitivos y el correcto plan semestral y/o periódico de desparasitación en canidos (con drogas como Praziquantel o Bromhidrato de Arecolina) ya que los adultos de *E. granulosus* pueden oviponer y liberar huevos al medio ambiente hasta por 40 meses manteniendo el ciclo biológico junto a la vacunación a ovinos.

Referencias bibliográficas

- A, Jabbar, J. (2011). Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease. *Parasitology*, 138(1).
- Anvari, D., Rezaei, F., Ashouri, A., Rezaei, S., Majidiani, H., Pagheh, A.S., Rezaei, F., Shariatzadeh, S.A. y Fotovati, A. (2021). Current situation and future prospects of *Echinococcus granulosus* vaccine candidates: A systematic review. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3):1080-1096.
- Armiñanzas, C., Gutiérrez-Cuadra, M. y Fariñas, MC. (2015). Hidatidosis: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Av. Valdecilla s/n 39008, Santander. *Rev Esp Quimioter*;28(3):116-124
- Echinococcus granulosus* EG95 vaccine antigen (EG95) mRNA, complete cds—Nucleotide—NCBI. (s. f.).
- Lightowlers, M.W., Lawrence, S.B., Gauci, C.G., Young, J., Ralston, M.J., Maas, D. y Heath, D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 18(9):457-462.
- Manterola, C., García, N. y Rojas, R. (2019). Aspectos generales del perfil *proteómico del Echinococcus granulosus*. *Int. J. Morphol.*, 37(2):773-779.
- Wang, L., Gao, J., Lan, X., Zhao, H., Shang, X., Tian, F., Wen, H., Ding, J., Luo, L., y Ma, X. (2019). Identification of combined T-cell and B-cell reactive *Echinococcus granulosus* 95 antigens for the potential development of a multi-epitope vaccine. **Annals of Translational Medicine**, 7:652-652.

CAPÍTULO 16

Capítulo Complejo de tristeza bovina

Mauro Joaquín Manfredi y Juan Manuel Unzaga

Introducción

El complejo tristeza bovina (CTB) es un complejo de enfermedades causadas por hemoparásitos del género *Babesia* (*B. bovis* y *B. bigemina*) y *Rickettsia* del género *Anaplasma* (*A. marginale*), transmitidas principalmente por ectoparásitos (garrapatas, tábanos y dípteros hematófagos) y material quirúrgico y agujas infectadas (infección iatrogénica).

Historia

Fue descrita en 1888 por el investigador biólogo rumano Victor Babes, quien concluyó que la enfermedad conocida como hemoglobinuria enzoótica era causada por un pequeño microorganismo intraeritrocitario el cual en su momento denominó *Haematococcus bovis*. Posteriormente, en 1893 se propuso el nombre *Babesia bovis* en su honor. En nuestro país los primeros registros sobre CTB fueron realizados por Lignieres, en 1903, al reconocer dos tipos diferentes de *Babesia*: una forma larga similar a la anteriormente descrita y otra más pequeña, que era difícil de encontrar en extendidos de sangre periférica, que se denominó *Piroplasma argentina* y, posteriormente, *Babesia argentina*. Las primeras especies de *Anaplasma* se documentaron en 1911, en aislamientos de sangre que describían la presencia de parásitos en una ubicación central dentro del eritrocito, por lo que se describió como *Anaplasma centrale*.

Agentes etiológicos

Babesia spp. pertenece al phylum Apicomplexa; familia Babesidae; son parásitos intraeritrocitarios obligados no pigmentados de forma piriforme, oval, bacilar o ameboide, según el estado de desarrollo parasitario. *B. bigemina* se considera dentro del grupo de Babesias grandes (4 – 5 µm), mientras que *B. bovis* pertenece al grupo de Babesias pequeñas (2,4 µm). Siempre se hallan parasitando en par formando un ángulo agudo dentro de la célula.

Anaplasma spp pertenece al phylum Pseudomonadota; orden Rickettsiales: familia Anaplasmataceae; son bacterias similares a rickettsias intraeritrocitarias, formando cuerpos densos y redondeados de unos 0,3–1,0 µm de diámetro, ya sean situados en el centro de la célula (*A. centrale*) o en la zona marginal (*A. marginale*).

Ciclo biológico de la babesiosis

Las babesias invaden los eritrocitos de los hospedadores intermediarios vertebrados en una etapa de reproducción asexual (esquizogonia o merogonia), formando merozoitos que salen del glóbulo rojo destruyendo e infectando a otros. Las garrapatas, que actúan como hospedadores definitivos, alojadas y adheridas al animal, adquieren los merozoitos al succionar sangre y dentro de estas se lleva a cabo el proceso de gametogonia, diferenciándose en cuerpos radiales (gametas masculinas y femeninas), que se fusionan dando lugar a un cigoto denominado ooquineto el cual alcanza las células del intestino de la garrapata. Allí comienza la esporogonia y el cigoto se divide dando origen a los esporoquinetos. Estos acceden a la hemolinfa e invaden y se multiplican en algunos órganos incluyendo los ovarios (*transmisión transovárica*) y las glándulas salivales. Cuando la garrapata se adhiere a un hospedador vertebrado, comienza la maduración y se forman los esporozoítos que son infectantes para el HI. El periodo prepatente (tiempo transcurrido entre la inoculación y observaciones de parásitos en sangre) para *B. bovis* y *B. bigemina* oscila entre 6 a 14 días luego de la infestación con larvas de la garrapata *Boophilus microplus*.

Patogenia y signos clínicos

Uno de los signos principales son anemia, decaimiento y depresión, caracterizado por el aislamiento del animal en relación al rodeo y la búsqueda de sombra. Se registran temperaturas de 41°C y otros signos comunes de ataxia, apatía, incoordinación, aumento de frecuencia respiratoria y, en menor medida, ictericia y hemoglobinuria. En las infecciones por *B. bigemina*, unos de los rasgos más característicos es la presencia de hemoglobinuria y anemia marcada, mientras que la elevación de temperatura y signos nerviosos no son tan frecuentes. La identificación precisa del agente causal se realiza en el laboratorio a partir del examen microscópico de extendidos de sangre. En el caso de *A. marginale*, el periodo de incubación dependerá de la carga que ingrese al animal, pero suele ser más largo que *Babesia* y oscila entre 3 – 4 semanas, donde se destaca principalmente la anemia, con valores de glóbulos rojos inferiores al 10%, coprostitias, ictericia y palidez de mucosa, desmejoramiento marcado, abortos en hembras gestantes.

Se ha observado que en infecciones por hemoparásitos se ven involucradas tanto la inmunidad innata como adquirida. La óptima inmunidad protectora contra infecciones por *Babesia spp.* requiere tanto anticuerpos fijadores de complemento como anticuerpos opsonizantes, así como de la activación de macrófagos, importante como células fagocíticas, eliminando tanto a parásitos

como a eritrocitos parasitados y la activación de linfocitos T subpoblación TH1. Se ha sugerido que el bazo juega un rol fundamental en el control de esta infección, gracias a la actividad fagocítica y de producción de anticuerpos que ahí se realiza. Los estudios *in vitro*, han mostrado que los monocitos derivados de sangre periférica tienen una gran actividad oxidativa y una capacidad fagocítica suprimida durante una infección primaria. En contraste, los neutrófilos exhiben una capacidad fagocítica incrementada, pero una reducida capacidad oxidativa en infección primaria. Estos signos coinciden con la mayor carga parasitaria, lo que ha sugerido que los monocitos y neutrófilos circulantes son mediadores activos de la respuesta inmune innata a infección primaria por *Babesia bovis*.

Distribución geográfica y aspecto epidemiológicos

Se considera endémica en la región del noreste argentino (NEA) hasta el paralelo 31°S y en zonas entre los paralelos 31°S y 33°S, dado que existe una gran distribución de garrapatas y vectores. La anaplasmosis tiene un área de dispersión mayor que la babesiosis, extendiéndose hasta el paralelo 33° de latitud Sur (Buenos Aires y La Pampa) donde ocurren brotes esporádicamente por la introducción de bovinos portadores de zonas endémicas. Son más de 20.000.000 de bovinos potencialmente expuestos, lo que equivale al 35% del stock nacional, pudiendo afectar tanto en tambos como en sistemas de producción de carne.

B. bovis es transmitida por las larvas de la garrapata de la especie *B. microplus*. *B. bigemina* puede ser transmitida por estadios de ninfa y adulto, por lo que la transmisión se la denomina *transmisión transestadial*. Los brotes del complejo se producen en los meses de verano y otoño cuando la población de garrapatas e insectos hematófagos aumenta considerablemente.

La transmisión de *A. marginale* puede ocurrir también de forma biológica (principalmente por garrapatas del género *Boophilus*) y de forma mecánica (transmisión por insectos hematófagos como moscas bravas del género *Haematobia*, tábanos, dípteros y mosquitos). También se han documentado transmisiones iatrogénicas a partir de elementos corto punzantes y transmisiones verticales (transplacentaria). Se ha demostrado que los bovinos que se infectan con *A. marginale* y superan la enfermedad quedan como portadores crónicos de por vida y pueden considerarse fuente de contagio. La susceptibilidad está condicionada por la experiencia inmunológica previa del animal en relación a la infección con anaplasmosis y factores como edad, raza y estado nutricional, ya que en ausencia de inmunidad específica, los animales de menor edad (terneros) presentan mayor resistencia a contraer anaplasmosis debido a características propias de su sistema hematopoyético, por lo que la enfermedad cursa sin consecuencias clínicas y estimula al desarrollo de una respuesta inmune permanente y altamente protectora. Este fenómeno permite la aplicación de zonas y conceptos de estabilidad e inestabilidad enzoótica, situación que será descripta más adelante.

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la inspección de casos sospechosos y signos clínicos y la situación epidemiológica a partir de hallazgos microscópicos de eritrocitos infectados (EI) obtenidos de sangre periférica (base de la cola u oreja), posterior a la coloración de Giemsa. Se observa en aumento de 100x con aceite de inmersión la presencia de elementos parasitarios dentro de los glóbulos rojos. La interpretación diagnóstica estará a cargo del profesional veterinario ya que la sola presencia de EI con hemoparásitos no es siempre indicativa de enfermedad, dado que existen animales portadores crónicos. Para esto es importante que se correlacionen datos anamnésticos, diagnóstico clínico y resultados hematológicos (índice hematocrito y composición globular). En el caso de hallarse agentes en sangre es importante determinar la proporción aproximada de EI, más conocido como porcentaje de parasitemia leves, moderadas y severas representado en la tabla 16.1.

Tabla 16.1. Aproximación diagnóstica de CTB

Animal vivo	<i>B. bovis</i>	Parasitemia > 0.2 % en frotis
	<i>B. bigemina</i>	Parasitemia > 1 % en frotis
	<i>A. marginale</i>	Parasitemia > 3% en frotis
Animal muerto	<i>B. bovis</i>	Presencia de parásitos en frotis, en corteza cerebral y cerebelo
	<i>B. bigemina</i>	> 1% EI en frotis
	<i>A. marginale</i> ¹	> 3% EI en frotis

Nota: En casos puede observarse parasitemia < 3% con anemia extrema (< 10%) por la destrucción de EI y no infectados como consecuencia de fenómenos de autoinmunidad.

Control e inmunoprofilaxis

El temor a la ocurrencia de brotes de babesiosis y anaplasmosis es reconocido como una de las principales causas de uso de acaricidas químicos para controlar garrapatas en nuestro país, en un escenario de creciente preocupación mundial por el surgimiento de la resistencia a los antiparasitarios y la presencia de residuos de xenobióticos en alimentos de origen bovino.

En ese contexto, el laboratorio de vacunas de INTA EEA Rafaela logró la producción de inmunógenos eficaces y seguros que constituyen en la actualidad la herramienta más efectiva y sustentable para la prevención de la babesiosis y anaplasmosis de los bovinos. De esta manera,

permiten estabilizar la productividad de los rodeos y, al reducir la dependencia a los antiparasitarios externos, promueven la sostenibilidad de la producción ganadera y la inocuidad de los alimentos de origen animal en la región de referencia.

Vacuna contra complejo de tristeza bovina

La prevención del complejo tristeza bovina se realiza mediante vacunas con inmunógenos vivos atenuados en su patogenicidad. En Argentina, la vacuna más empleada es el resultado de un convenio de transferencia tecnológica entre la EEA-INTA Rafaela y la empresa Litoral Biológicos y se comercializa con el nombre de fantasía *Bio JaJa*.

Inmunógenos esenciales

La misma se encuentra conformada con $\sim 10^7$ glóbulos rojos infectados (G.R.I.) con los hemoparásitos correspondientes (*B. bovis*, *B. bigemina*, y *A. centrale* que da inmunidad cruzada con *A. marginale*) obtenidos a partir de pasajes en células de terneros esplenectomizados. Se caracteriza por ser una vacuna mixta (contiene *Babesia* como hemoparásitos y *Anaplasma* como rickettsia), monovalente (cepa de *A. centrale*) polivalente (contiene dos especies de *Babesia*), homóloga y heteróloga (inmunidad cruzada de *Anaplasma*), de carácter profiláctico. Se formula y comercializa en pajuelas de semen conservadas en nitrógeno líquido (-196°C).

Protocolo de vacunación

La dosis a administrar es de 2 ml por animal por vía subcutánea o intramuscular, siendo de vital importancia el cambio de jeringas y agujas entre inoculación para evitar la transmisión iatrogénica. Las categorías a las que va dirigida la vacuna son terneros clínicamente sanos de 4 a 10 meses de edad y bovinos adultos en zonas de inestabilidad enzoótica o adultos que se trasladan de zonas libres de garrapatas a zonas endémicas. Se advierte que se pueden presentar reacciones post vacunales (incluso mortales) si se vacuna a bovinos mayores de 10 meses de edad.

¿Vacunar sí o no?

Debido a que existe una resistencia de animales jóvenes luego de la toma del calostro y en casos donde la enfermedad se presenta a temprana edad, es necesario establecer un criterio

inmunológico que justifique el uso de la vacuna en áreas no endémicas. En función de la frecuencia con que se observan casos clínicos, es posible dividir las regiones en un *área enzoótica estable* caracterizada por la presencia de un número suficiente de garrapatas que transmiten la infección a la mayoría de los bovinos a edad temprana (antes del año de edad, cuando todavía son relativamente resistentes. En este caso la prevalencia de infección por *Babesia* en los animales es elevada y solo se observan casos clínicos aislados y un *área enzoótica inestable o marginal* caracterizada por variaciones en la población de garrapatas entre años y estaciones que trae como consecuencia que una elevada proporción de animales no se infecten durante el periodo de mayor resistencia y lo hace cuando son adultos. En este caso, la aparición de brotes es elevada.

Un importante concepto epidemiológico propuesto por Mahoney y Ross en 1972 es la *tasa de inoculación (H)*, es decir, la probabilidad diaria que tiene un animal de infectarse, y puede desglosarse como el producto promedio de picaduras por día que recibe el animal (m), la proporción de larvas infectadas (a) y la proporción de picaduras que logran infectar al animal (b), expresada como $H = m \cdot a \cdot b$. En el modelo desarrollado se prevé el cálculo de la *tasa de inoculación* por medio de pruebas serológicas, como ELISA, Fijación del complemento, aglutinación en látex, hemoaglutinación pasiva, IFI y PCR para detectar animales positivos. Los valores obtenidos permitirán clasificar a los rodeos en tres categorías, de acuerdo al grado de riesgo de ocurrencia de brotes de CTB:

- *Estabilidad enzoótica* como área previamente descripta cuando H es de 0,005 o superior, lo que significa que el 75% o más del rodeo se infectara antes de los 9 meses de edad y cursaran subclínicas e inducen inmunidad duradera que se va renovando con nuevas picaduras infectantes.
- *Inestabilidad de alto riesgo* cuando H varía 0,0005 y 0,005, donde la probabilidad de brotes es elevada ya que entre un 20 a 75 % de animales quedarán expuestos a contraer la infección. En estas condiciones está plenamente justificado el correcto control de la enfermedad y la aplicación de vacunas.
- *Inestabilidad de bajo riesgo* cuando la H es $< 0,0005$, donde la probabilidad de aparición de brotes es baja ($< 20\%$), a menos que aumente la población de vectores transmisores. Desde el punto de vista económico dejaría en duda la aplicación de un constante protocolo de vacunación e implementación de medidas preventivas.

Referencias bibliográficas

- Álvarez F.R., Peichoto M.E, Palma S., Maletto B. y Lozina L. (2022). Evaluación preliminar del poder antigénico in vivo de una nueva formulación para la inmunoprofilaxis de la babesiosis bovina. *Revista Veterinaria*, 33(2):266. <https://doi.org/10.30972/vet.3326194>
- Florin-Christensen M., Suarez C.E., Rodriguez A.E., Flores D.A. y Schnittger L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12):1563-1592.
- Mahoney D.F. y Ross D.R. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 5: 292-298.
- OIE. (2015). Anaplasmosis Bovina. *Manual Terrestre*. Capítulo 3.4.1. Sección. 3.4.
- Vanzini V.R. y Ramirez L.M. (1994). Babesiosis y Anaplasmosis Bovina: Diagnóstico, epidemiología y control. *INTA-Argentina RIA*, 25(3), 137-190.

Autores

Coordinadores

Larsen Alejandra Edith

Médica Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP); Bacterióloga Clínica e Industrial (FCV.UNLP); Magister en Microbiología Molecular (Malbrán). Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV.UNLP). Profesora Asociada, Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada (FCV.UNLP); Profesora Adjunta Cátedra de Inmunología IIa Parte, carrera de Microbiología (FCV.UNLP). Directora del proyecto de extensión universitaria “Tambos y cerdos sanos”.

Mortola Eduardo

Médico Veterinario - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP). Doctor en Ciencias Veterinarias, FCV-UNLP. *PhD in Veterinary Sciences*, University of Tokyo, Japan. Postdoc at The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. Profesor Titular de Inmunología Veterinaria Aplicada, FCV-UNLP. Director de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP. Director proyectos de Inmunología y virología.

Autores

Barragán, Javier

Médico Veterinario. Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP). Bacteriólogo Clínico e Industrial. FCV-UNLP. Profesor Adjunto de la Cátedra de Inmunología IIa Parte de la Carrera de Bacteriología Clínica e Industrial, FCV-UNLP. Departamento de Producción de Sueros y Vacunas del Laboratorio Central de Salud Pública dependiente del Ministerio de Salud Provincia de Buenos Aires (MSPBA).

Herrera Sampóns, Rafael Sergio

Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Ayudante diplomado de Inmunología Animal Aplicada FCV.UNLP. Ayudante diplomado

de Histología y Biología celular, FCV.UNLP. Asistente de la Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP.

Iza, Emilio Raul

Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Ayudante diplomado en Microbiología FCV.UNLP. Ayudante adscripto de Inmunología Animal Aplicada, FCV.UNLP. Asistente de la Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP.

Koval, Ariel

Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires (FCV.UBA). Docente en la Especialización de diagnóstico de laboratorio (FCV.UBA). Referente OIE SENASA de diagnóstico, control y prevención de Leptospirosis. Gerente de producción Laboratorio Biogénesis.

Manfredi, Mauro Joaquin

Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Ayudante diplomado de Inmunología Animal Aplicada, FCV.UNLP. Becario CIC de doctorado en Ciencias Veterinarias FCV.UNLP. Asistente de la Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio FCV.UNLP.

Martin, Paula Lorena

Médica Veterinaria. Doctora en Ciencias Veterinarias. Especialista en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio. Docente Universitario Autorizado, en curso. Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Jefe de Trabajos Prácticos del Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela. Cátedra de Análisis Clínicos Veterinarios. Docente del curso de Análisis Clínicos Veterinarios. Docente de la Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio de la UNLP. Docente-Investigador de Proyectos de Investigación aprobados por la Secretaría de Políticas Universitarias Ministerio de Educación de La Nación. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata

Miceli, Graciela

Bacterióloga Clínica e Industrial. Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV.UNLP). Profesor Adjunto de Inmunobiología Animal Aplicada FCV.UNLP. Docente de la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio FCV.UNLP.

Salinas, Marcos Daniel

Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Ayudante diplomado de Inmunología Animal Aplicada, FCV.UNLP. Ayudante diplomado

de Virología, FCV.UNLP. Becario Conicet de doctorado en Ciencias Veterinarias, FCV.UNLP. Asistente de la Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, FCV.UNLP.

Traveria, Gabriel Eduardo

Doctor en Ciencias Veterinarias, Médico Veterinario, Bacteriólogo Clínico e Industrial, FCV UNLP. Profesor Titular en el CEDIVE, Profesor Adjunto de la Cátedra de Inmunología Veterinaria, Profesor de Clínica y sanidad de rumiantes y Enfermedades de los rumiantes y cerdos. Docente de la Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario FCV.UNLP. Dirección de tesis-tas, becarios, pasantes y residentes en el CEDIVE, FCV, UNLP. Investigador en proyectos de investigación y desarrollo.

Unzaga, Juan Manuel

Doctor en Ciencias Veterinarias, Bacteriólogo Clínico e Industrial, Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. FCV.UNLP. Máster en Enfermedades Parasitarias Tropicales, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia. Profesor Titular en la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias y Profesor Adjunto en el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA-FCV-UNLP), Departamento de Epizootiología y Salud Pública (FCV-UNLP).

Mortola, Eduardo

Vacunas en rumiantes domésticos / Eduardo Mortola ; Alejandra Edith Larsen ;
Coordinación general de Eduardo Mortola ; Alejandra Edith Larsen. - 2a ed. - La Plata :
Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2026.
Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-2680-7

1. Vacunación. 2. Veterinaria. 3. Rumiantes. I. Larsen, Alejandra Edith II. Mortola, Eduardo,
coord. III. Larsen, Alejandra Edith, coord. IV. Título.
CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2026
ISBN 978-950-34-2680-7
© 2026 - Edulp

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA