

Incorporación de la Académica de Número Dra. Ana María Sadir

Conferencia

Nueva generación de vacunas

A. M. Sadir^{a, b, c}

^a Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (CICV), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, CC77, 1708 Morón, Argentina

^b Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina

^c CONICET, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

La inmunización activa, que por lo general se refiere a la administración de una vacuna que puede inducir una respuesta inmune protectora, puede lograr una protección de larga duración frente a los agentes infecciosos.

La duración de la protección está influida por muchos factores del hospedador, incluyendo entre ellos la edad, la competencia inmunitaria y la presencia de anticuerpos maternos en la circulación del animal.

El tipo y la duración de la respuesta inmune también dependen de muchos atributos de la propia vacuna.

La duración de la protección lograda con las vacunas inactivadas suele ser más corta que la inducida por vacunas vivas modificadas.

Cuando resulta posible, eficaz y segura, la vacunación es uno de los métodos más eficaces en *relación* con su coste para controlar las enfermedades infecciosas no sólo de los animales de compañía sino también de los de abasto. Algunas enfermedades infecciosas que poseen reservorios silvestres, como la rabia, también se pueden controlar en algunas especies animales mediante la vacunación. Por lo tanto, las ventajas de la vacunación no se limitan a reducir la morbilidad y la mortalidad en los animales vacunados, ya que la transmisión de enfermedades zoonóticas como las rabias se pueden aminorar en la especie humana de manera sustancial mediante la vacunación de perros y gatos. Aunque muchas de las vacunas actualmente comercializadas para uso animal se producen siguiendo métodos convencionales, la llegada de la biotecnología ha supuesto una oportunidad para desarrollar vacunas con una eficacia mejorada y una mayor seguridad. Las vacunas inactivadas suelen contener muchas sustancias antigénicas irrelevantes, algunas de las cuales poseen una actividad biológica no deseada. Las vacunas vivas atenuadas pueden producir reacciones adversas, incluyendo la inmunosupresión. A pesar de esas limitaciones, las vacunas convencionales seguirán siendo empleadas hasta que sean

reemplazadas por vacunas vivas de subunidades o producidas mediante ingeniería genética más eficaces y seguras.

Nuestro equipo de trabajo llevo adelante el desarrollo de una vacuna contra Herpesvirus Bovino, que permite diferenciar vacunados de infectados, conteniendo como antígeno Herpesvirus Recombinante el cual portaba la delección completa del gen que codifica proteína viral gE y su reemplazo por la proteína β -galactosidasa (BoHV1 Δ gE β gal).

Este desarrollo admite la formulación de vacunas, utilizando tanto el virus recombinante inactivado como sin inactivar, debido a que la delección del gen de gE provoca en el virus BoHV1 Δ gE β gal, una gran atenuación de su patogenicidad en bovinos.

METODOLOGÍA

Una vez obtenida la cepa recombinante BoHV1 Δ gE β gal se evaluó la capacidad inmunogénica y protectora inmunizando bovinos con la cepa recombinante formulada como vacuna inactivada o viva atenuada.

A. Vacuna inactivada

Se utilizaron 16 bovinos Hereford x Angus y Holando de 8 a 12 meses de edad, separados en dos grupos de vacunados inmunizados con 3 ml por vía subcutánea: vacuna BoHV1 Δ gE β gal inactivada adyuvante oleoso (IBoHV1 Δ gE β gal, n=5); vacuna BoHV1 inactivada con adyuvante oleoso (IBoHV1; n=5) y un grupo control sin vacunación (n=6). Al momento de la vacunación todos los bovinos fueron seronegativos a BoHV1 (evaluados por seroneutralización y ELISA), se los revacunó a los 21 días post vacunación (dpv) y se desafiaron con el virus infeccioso BoHV1 LA ($10^{7.5}$ DICT_{50/ml}) a los 186 dpv. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones de las Guías Internacionales de Cuidado y Uso Animal. El desafío se realizó en boxes de NBS 2 con aire filtrado y presión negativa. Los bovinos fueron sangrados a distintos tiempos, con heparina para ensayos de linfoproliferación y sin heparina para serología. A su vez se tomaron muestras de secreciones nasales a distintos días posdesafío (dpd) y tituladas en células MDBK.

B. Vacuna viva atenuada

Se utilizaron 25 bovinos (12 a 18 meses) seronegativos a BoHV1. Se trabajó con 3 grupos de vacunados inmunizados con 4 ml ($10^{8.25}$ DICT_{50% ml}) de la vacuna viva atenuada:

por vía intranasal (LBoHV1ΔgEβgal in); por vía intramuscular (LBoHV1ΔgEβgal im) y por vía intravenosa (LBoHV1ΔgEβgal iv). En el grupo LBoHV1ΔgEβgal iv, se utilizaron hembras preñadas para evaluar la seguridad de la vacuna viva en cuanto a transmisión vertical. Un grupo fue usado como centinela y no recibió vacuna ni desafío y otro como grupo control de desafío (sin vacunación). Para evaluar seguridad en cuanto a transmisión horizontal a los 3 días de que los animales fueron vacunados se pusieron en contacto con los centinelas. Los signos clínicos y excreción viral fueron controlados durante 42 dpv. Los grupos vacunados con LBoHV1ΔgEβgal in, im y los controles fueron desafiados por aerosol con 4 ml de BoHV1 salvaje ($10^{7.5}$ DICT_{50/ml}) a los 42 dpv. Se tomaron muestras de sangre e hisopados nasales a distintos dpv y dpd. El grupo LBoHV1ΔgEβgal iv de hembras preñadas, no fue desafiado. Los niveles de excreción viral se evaluaron como log₁₀ DICT_{50/ml} de fluido nasal. Los bovinos fueron examinados clínicamente y los parámetros evaluados incluyeron anorexia, temperatura corporal, conjuntivitis, rinitis y vulvovaginitis. La escala para el estatus de rinitis fue (0=ausencia; 1=serosa leve; 2=serosa severa; 3= seromucosa y 4=mucopurulenta).

Evaluación de seguridad de la vacuna viva atenuada en cuanto a transmisión vertical

Como se mencionó anteriormente en el grupo LBoHV1ΔgEβgal iv, se seleccionaron 5 vacas preñadas (cursando entre el tercer y sexto mes de gestación) e inoculadas por vía iv con la vacuna viva atenuada. Las vacas fueron evaluadas tanto clínicamente como inmunológicamente durante un período de 42 días junto a los demás grupos experimentales. Durante la experiencia de desafío este grupo no fue expuesto al virus parental BoHV1 salvaje, pero siguieron siendo evaluadas hasta los 370 días post-vacunación incluyendo sus correspondientes pariciones.

RESULTADOS

Se desarrolló un nuevo virus recombinante BoHV1ΔgEβgal

Con el objeto de desarrollar el virus recombinante se realizó un ensayo de recombinación homóloga entre el DNA del virus BoHV1 salvaje y un plásmido de recombinación que contiene las secuencias homólogas flanqueantes al gen gE y el gen marcador de la βgalactosidasa. Se procedió a la generación de los fragmentos homólogos por amplificación por PCR y a clonados sucesivos en diferentes construcciones de manera

tal que se arribó al vector PuLR β gal. Una vez confirmada la estructura del clon PucLR- β gal se utilizó en los ensayos de co-transfección. La selección primaria de clones recombinantes se realizó macroscópicamente mediante un ensayo de revelado de la expresión de la enzima β -galactosidasa, en monocapas de células inoculadas con el producto de la co-transfección. Luego se obtuvieron focos aislados que permitieron seleccionar clones virales individuales. Para la purificación del virus recombinante putativo, se sometió el clon a cinco pasajes sucesivos bajo medio semisólido, en condiciones de revelado de la enzima β -gal. Se corroboró la delección de gE en el virus BoHV1 Δ gE β gal por PCR utilizando primers específicos a gE, utilizando DNA del clon de BoHV1 Δ gE β gal seleccionado y BoHV1 como control. También se realizó la caracterización genética del recombinante BoHV1 Δ gE β gal por Southern Blot digiriendo el genoma viral con la enzima HindIII y enfrentando los fragmentos a sondas marcadas con 32 S de las regiones gE, L, y R en tres ensayos independientes respectivamente, confirmando que solo las sondas L y R hibridizaron tanto con el genoma del virus BoHV1 como con BoHV Δ gE β gal y, como era de esperar, la sonda E solo hibridizó con el genoma BoHV1 parental, esto permitió confirmar en el “clon a” de BoHV1 Δ gE β gal la ausencia de secuencias codificantes para la gE y que las secuencias flanqueantes L y R permanecieron intactas. Con el objeto de analizar la ausencia de la proteína gE en el “clon a” de BoHV1 Δ gE β gal, se procedió a su detección en un ensayo de Western blot a través del uso de anticuerpos monoclonales anti gD y gE incubados tanto con el perfil de proteínas de BoHV1 Δ gE β gal como de BoHV1 LA. El anticuerpo anti gD reaccionó con ambos virus, sin embargo el anticuerpo monoclonal específico para gE no reaccionó con ninguna de las proteínas de la cepa viral recombinante BoHV1 Δ gE β gal (clon a), mientras que sí lo hizo con la proteína en la cepa BoHV1 LA parental. Esto indica que la cepa viral recombinante no sintetiza la gE, confirmando lo observado a nivel genético.

Caracterización de la habilidad replicativa del clon BoHV1 Δ gE β gal

A fines de conocer la viabilidad y la eficiencia replicativa de la cepa BoHV1 Δ gE β gal, se realizó un ensayo de cinética de crecimiento en múltiples pasos en monocapas de células MDBK, en donde se comparó durante 60 horas el comportamiento replicativo en cultivos celulares del clon purificado BoHV1 Δ gE β gal y la cepa BoHV1 parental. Los resultados obtenidos al cosechar y titular cada 6 horas los productos virales de ambos virus reflejaron un crecimiento en cultivo de tejidos de la cepa

BoHV1 $\Delta\beta$ gE β gal similar al descrito para la cepa BoHV1 parental. Se detectaron títulos superiores a 10^7 DICT₅₀/ml desde las 18 hs post-infección y se mantuvieron hasta el final del ensayo. Por ello la cepa BoHV1 Δ gE β gal resultó una buena candidata para su amplificación en escala y su utilización en la formulación de una vacuna inactivada y también su utilización directa como vacuna viva.

Caracterización inmunogénica de la cepa viral BoHV1 Δ gE β gal.

La cepa BoHV1 Δ gE β gal utilizada tanto como vacuna inactivada o como viva atenuada resultó inmunogénica y protectora

Con el objeto de evaluar la integridad de la cepa BoHV1 Δ gE β gal desde el punto de vista inmunogénico se inmunizaron dos grupos de bovinos con vacuna inactivada usando las cepas recombinante BoHV1 Δ gE β gal (IBoHV1 Δ gE β gal) y parental BoHV1 LA (IBoHV1LA) y 3 grupos con vacuna viva atenuada por vía im, iv e in (LBoHV1 Δ gE β gal im, LBoHV1 Δ gE β gal iv, LBoHV1 Δ gE β gal in). La inducción de respuesta humoral se evaluó por el test de ELISA y seroneutralización según lo descrito previamente (Parreño 2010; Romera 2000). En todos los animales vacunados se detectaron niveles de anticuerpos a partir de los 19 días post-vacunación llegando a títulos seroneutralizantes de 4 (expresados en log 10) a los 30 dpv en ambos grupos de vacunados con vacuna inactivada y alrededor de 2 en los vacunados con vacuna viva atenuada (im e iv). Los anticuerpos neutralizantes comenzaron a detectarse a los 30 dpv con títulos alrededor de 2 (expresados en log 10) para los vacunados con vacuna inactivada y, si bien en los vacunados con vacuna viva atenuada se detectaron antes, éstos alcanzaron niveles de alrededor de 1,5. Al momento del desafío los vacunados con vacunas inactivadas presentaron títulos en promedio de anticuerpos totales de 2,7 y de 2 para los vacunados con vacuna viva atenuada. No se registraron anticuerpos neutralizantes en el grupo vacunados por vía intranasal, ni en no vacunados y centinelas en el período postvacunación. Los niveles de anticuerpos totales y neutralizantes inducidos por la vacuna marcadora inactivada IBoHV1 Δ gE β gal no difieren significativamente de los inducidos por la vacuna IBoHV1 LA convencional.

Los niveles de inmunidad celular específica a los 7 dpv evaluados en término de activación de linfocitos T por el ensayo de linfoproliferación y por secreción de interferón (IFN- γ) fueron significativamente mayores en los animales vacunados con vacuna viva

(100%, 60% y 25% de animales positivos en los grupos in, im e iv respectivamente) que los vacunados con vacuna inactivada.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal es protectora frente al desafío viral con la cepa salvaje BoHV1 LA

La excreción viral en el grupo de no vacunados fue de 12 días y tuvo un máximo de excreción viral a los 8dpd con un título de 6.1 DICT50%/ml y descarga serosa severa a mucosa durante dos semanas aproximadamente. Los títulos virales excretados por los animales vacunados fueron por un período máximo de 10 días y significativamente menores en todo el período que los controles sin vacunar desafiados (2 logaritmos menos) y, en el día pico, la diferencia fue de 4 logaritmos menos respecto de los controles. Todos los animales vacunados con la cepa marcadora BoHV1 Δ gE β gal presentaron síntomas clínicos y rinitis significativamente menor que los controles de desafío. Los vacunados con vacuna inactivada presentaron rinitis serosa leve a severa mientras que los vacunados con la vacuna atenuada tuvieron ausencia de rinitis o serosa leve.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal es eficaz como vacuna marcadora

Para la evaluación de anticuerpos específicos contra gE se utilizó el ELISA Herdchek (IDEXX, Bélgica).

Solo los animales vacunados con BoHV1 tuvieron anticuerpos contra gE durante todo el periodo de estudio a diferencia de los vacunados con BoHV1 Δ gE β gal en los que se detectaron solo a partir de los 14 días post desafío en que se los enfrentó con el virus salvaje.

La cepa BoHV1 Δ gE β gal es atenuada

El virus vivo modificado BoHV1 Δ gE β gal mostró una alta atenuación ya que, luego de la vacunación, los 15 animales que recibieron la vacuna viva exhibieron solo signos clínicos leves de infección (ausencia de rinitis o rinitis serosa) como único signo de enfermedad. Adicionalmente, no se detectó virus infeccioso en las secreciones nasales de los animales vacunados con BoHV1 Δ gE β gal, independientemente de la ruta de inoculación.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal atenuada es segura en cuanto a capacidad abortigénica y transmisibilidad de la infección por la cepa vacunal.

Para determinar la seguridad de la vacuna atenuada en cuanto a su abortigenicidad, se inocularon por vía intravenosa 5 hembras que cursaban el último tercio de la gestación. Todas las hembras tuvieron pariciones normales, con terneros sanos. Éstos presentaron títulos de anticuerpos contra BoHV1 de 1.6 al noveno día de vida indicando la absorción de inmunoglobulinas específicas desde el calostro materno. Aunque la vía IV podría considerarse la más agresiva, BoHV1 Δ gE β gal demostró ser inocuo, no causando efectos adversos ni malformaciones o momificaciones. Las vacas preñadas que se mantuvieron vacunadas, pero sin desafiar para evaluar la seguridad de la vacuna en la preñez, tuvieron TN de anticuerpos contra BoHV1 de 1.6 hasta los 370 dpv, demostrando que la vacuna atenuada administrada por vía iv induce una larga inmunidad.

En cuanto a la transmisibilidad horizontal de la cepa, no se detectó virus infeccioso en las secreciones nasales de animales que actuaron como controles no vacunados y centinelas desde el tercer día post inoculación, a lo largo del período post-vacunal.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló en Argentina una nueva cepa de BoHV1 deleteada en la glicoproteína E portando la enzima β galactosidasa como gen marcador (BoHV1 Δ gE β gal).
- La cepa BoHV1 Δ gE β gal podría ser amplificada a nivel industrial ya que presentó una cinética de crecimiento similar a la que presenta la cepa BoHV1 LA salvaje en cultivo de tejidos.
- La inmunogenicidad de la cepa BoHV1 Δ gE β gal se mantuvo intacta, comparada con la cepa parental, cuando se la utilizó como un inmunógeno inactivado induciendo niveles de respuesta inmune y protección comparables a los inducidos por la vacuna BoHV1 LA convencional actualmente en uso.
- El virus BoHV1 Δ gE β gal podría ser utilizado además como vacuna atenuada ya que indujo una buena respuesta inmune específica tanto humoral como celular que resultó protectora frente al desafío viral, independientemente de la vía de inoculación.
- La cepa BoHV1 Δ gE β gal viva atenuada es segura ya que se comprobó que, en las condiciones experimentales no hubo transmisión por contacto a animales vírgenes, ni fue abortigénica.
- La vacuna BoHV1 Δ gE β gal es eficaz como una vacuna marcadora ya que, en base a la respuesta de anticuerpos inducidos en los bovinos vacunados con BoHV1 Δ gE β gal se

pudo diferenciar fácilmente tanto de los animales vacunados con BoHV1 como de los bovinos sin vacunar y de los desafiados con BoHV 1.

Este nuevo desarrollo permite contar con una valiosa herramienta para iniciar futuros programas de control e y erradicación en nuestro país.

Este trabajo fue publicado en BMC Veterinary Research 2014, (1) 10:8.

Palabras clave: BoHV-1ΔgEβgal, vacuna marcadora contra BoHV1, vacuna inactivada, vacuna viva atenuada, bovinos

Keywords: BoHV-1ΔgEβgal, BoHV-1 marker vaccine, Inactivated/live attenuated vaccine, Bovines.

BIBLIOGRAFÍA

- Jones, C. & Chowdhury, S., 2007: A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 8(2):187-205.
- Ellis, J.A., 2009: Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10(2):149-153.
- Odeón, A.C., Spath, E.J.A., Paloma, E.J., Leunda, M.R., Fernandez Sainz, I.J., Perez, S.E., Kaiser, G.G., Draghi, M.G., Cetrá, B.M., Cano, A., 2001: Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria (Argentina)*, 82: 216–220.
- Campos, F.C., Franco, A.C., Humber, S.O., Oliveira, M.T., Silva, A.D., Esteves, P.A., Roehem, M.P. and Rijsewijk, F.A., 2009: High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 y 5 found in cattle in Southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, 139: 67-73.
- Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., and Rijsewijk, F.A., 1996: Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, 53(1-2):43-54.
- Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., 2006: Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 8):2149-2154.
- Parreño, V., Romera, S.A., Makek, L., Rodriguez, D., Malacari, D., Maidana, S., Comparé, D., Combessies, G., Vena, M.M., Garaicoechea, L., 2010. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. *Journal of Virological Methods*, 169(1):143-153.
- Romera, S.A., Hilgers, L.A, Puntel, M., Zamorano, P.I., Alcon, V.L., Dus Santos, M.J., Blanco Viera, J., Borca, M.V., Sadir, A.M., 2000: Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine*, 19(1):132-141.