

Caracterización de la respuesta inmune humoral anti *Clostridium chauvoei* en bovinos

Universidad de la República, Facultad de Ciencias
Licenciatura en Bioquímica
Tesina de Grado

Febrero 2014

**Mariana Rivera Patron
4.070.094-3**

**Orientador: Msc. Andrea Rossi
Co-Orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity**



Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene
Facultad de Medicina - UdelaR



Contenido

Contenido	1
Abreviaturas	2
Palabras clave	2
Resumen	3
Introducción	4
Clostridiosis y <i>Clostridium chauvoei</i>	4
Respuesta inmune.....	5
Vacunas contra <i>C. chauvoei</i>	6
Objetivos.....	9
Objetivos específicos.....	9
Materiales y métodos.....	10
Ensayos de vacunación y desafío en bovinos.....	10
Preparación de antígenos	11
ELISA.....	11
Western Blot.....	12
Análisis estadístico.....	13
Resultados.....	14
Optimización de ELISA específico contra <i>C. chauvoei</i>	14
Evaluación de la respuesta humoral frente a vacunación y desafío contra <i>C. chauvoei</i> . Análisis comparativo entre la respuesta de anticuerpos y la protección frente al desafío	16
Evaluación de la duración de la inmunidad frente a vacunación contra <i>C. chauvoei</i>	20
Identificación de posibles proteínas inmunogénicas de <i>C. chauvoei</i> mediante Western Blot.....	21
Discusión y conclusiones.....	22
Perspectivas.....	26
Agradecimientos.....	27
Bibliografía.....	28

Abreviaturas

- Ag:** Antígeno
- Ag_{Son}:** Antígeno Sonicado
- Ag_{HS}:** Antígeno heat shock
- Ag_{TOT}:** Antígeno total
- BSA:** Seroalbúmina bovina
- CctA:** Toxina A de *Clostridium chauvoei*
- CFR:** Código Federal de Regulaciones de Estados Unidos
- DL₅₀:** Dosis letal 50
- Dpv:** día(s) post vacunación
- ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- FC:** Frecuencia cardíaca
- FR:** Frecuencia respiratoria
- kDa:** kilodalton
- mA:** miliampere
- OD:** Densidad óptica
- ON:** Toda la noche
- PBS:** Buffer fosfato salino
- PBST:** solución al 0,05% de Tween®20 en Buffer fosfato salino
- 1% BSA PBST:** solución al 1% (p/v) de BSA en PBST
- Ph. Eu.:** Farmacopea europea
- PMN:** leucocitos polimorfonucleares
- PVDF:** membrana de polivinildenedifloride
- rpm:** revoluciones por minuto
- S/C:** vía sub-cutánea
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
- TA:** Temperatura ambiente
- TLLC:** Tiempo de llenado capilar
- UA:** Unidades arbitrarias

Palabras clave

Vacunas veterinarias; *Clostridium chauvoei*; anticuerpos; eficacia.

Resumen

La generación de conocimiento y la comprensión del funcionamiento del sistema inmune han permitido desarrollar nuevas vacunas y optimizar las existentes, provocando una expansión a nivel mundial en la industria productora de vacunas. El sector de vacunas veterinarias no ha sido la excepción y esta expansión ha traído como consecuencia una tendencia a aumentar las exigencias, alcanzando niveles similares a los requeridos para las vacunas humanas. Los organismos reguladores exigen para las vacunas veterinarias controles de calidad, potencia, inocuidad y esterilidad para cada lote de vacuna producido. Además, para registrar una nueva vacuna se exige la realización de controles de eficacia en especies de destino.

Las vacunas clostridiales son componentes fundamentales de los esquemas de sanidad del ganado ya que constituyen el principal mecanismo para prevenir las clostridiosis, causadas por bacterias del género *Clostridium*, para las que no existe un tratamiento eficaz. *C. chauvoei* es el agente etiológico de la gangrena gaseosa y del carbunco sintomático, enfermedades de incidencia mundial que afectan principalmente a bovinos jóvenes, y se considera que son de las principales causantes de pérdidas económicas. Dado que no se conocen cuales son los antígenos que confieren inmunidad protectora contra *C. chauvoei*, en las vacunas clostridiales éste es incluido en forma de bacterina. Asimismo, no se han dilucidado completamente cuáles son los mecanismos del sistema inmune involucrados en la protección de los animales.

En este contexto, y en colaboración con una industria nacional productora de vacunas clostridiales, se estudió la respuesta inmune humoral a corto y largo plazo generada frente a vacunación y desafío contra *C. chauvoei* en bovinos. Para ello se optimizó un ELISA específico contra *C. chauvoei*, que permitió titular la respuesta humoral inducida por la vacunación. En particular, se observó que los animales vacunados respondieron exhibiendo un alto título de anticuerpos luego de dos inmunizaciones y de la revacunación anual, sugiriendo que la vacuna induciría respuesta de memoria inmunológica. Si bien existe cierta correlación entre la respuesta humoral y la protección de los animales vacunados, nuestros resultados preliminares sugerirían la respuesta humoral por sí sola no sería suficiente para la evaluación de la eficacia, siendo necesario realizar estudios más exhaustivos para evaluar qué otros mecanismos estarían involucrados en la protección de esta infección. Además, se estudió el patrón diferencial de reconocimiento antigénico entre animales vacunados y no vacunados mediante *Western Blot*. Los resultados exhibieron bandas que podrían corresponder con proteínas candidatas a antígenos involucrados en la inmunogenicidad de *C. chauvoei*. Algunas de estas bandas podrían correlacionarse con proteínas reportadas en la literatura como inmunogénicas, sin embargo se requeriría su confirmación mediante estudios de proteómica.

Introducción

Con el fin de mantener la salud de los animales y el buen funcionamiento de los programas de sanidad animal es imprescindible la administración de vacunas puras, inocuas, potentes y eficaces. La inmunización de los animales con vacunas de buena calidad es el principal método de control de muchas enfermedades animales. La eficacia de las vacunas como medio de control varía entre las diferentes enfermedades, por ello algunas vacunas pueden ser muy eficaces previniendo la infección y diseminación del agente infeccioso; otras pueden prevenir la enfermedad pero no la infección; y en otros casos, solo puede reducir la severidad de la enfermedad (OIE, 2008).

En tal sentido, el diseño y desarrollo de nuevas vacunas y la optimización de las existentes requiere del conocimiento profundo de las características del agente infeccioso y de los mecanismos inmunológicos inducidos por la vacuna en los animales de destino. La generación de conocimiento y los avances biotecnológicos, han contribuido en ese sentido y han generado una expansión a nivel mundial del sector. Dicha expansión ha traído como consecuencia una tendencia a aumentar las exigencias de la industria veterinaria, al punto de ser muy similares a las de la industria farmacéutica productora de vacunas para humanos (Chabalgoity, 2005). Uruguay no es la excepción a esta situación mundial, ya que la industria productora de vacunas veterinarias ha tenido una importante expansión en la última década convirtiéndose en un sector relevante en la generación de nuevas exportaciones de nuestro país (Snoeck et al., 2009). En particular, las vacunas clostridiales son componentes fundamentales de los esquemas de sanidad del ganado ovino y bovino ya que constituyen el principal mecanismo para prevenir las clostridiosis.

Clostridiosis y *Clostridium chauvoei*

Se le denomina clostridiosis a un conjunto de enfermedades infecciosas no contagiosas causadas por bacterias del género *Clostridium*. Una de las clostridiosis más importantes que afecta al ganado bovino y ovino, es la causada por *Clostridium chauvoei*, un bacilo *Gram* positivo, móvil, estrictamente anaerobio, que posee capacidad de esporular cuando el medio no le es favorable, siendo capaz de perdurar en el suelo, su reservorio natural, de manera viable durante años (Hirsh, 2004). Hay dos enfermedades que se pueden desencadenar por la infección de *C. chauvoei*, una de ellas se conoce como “mancha” o carbunco sintomático, y la otra se denomina gangrena gaseosa; esta última también puede ser causada por *C. novyi*. Ambas presentan incidencia mundial y una vez que se desarrollan no existe un tratamiento

eficaz para contrarrestarlas. Aunque es posible tratar animales enfermos no moribundos con penicilina, los resultados por lo general no son buenos debido a la gran extensión de las lesiones, y los animales infectados mueren por intoxicación sistémica a los pocos días de comenzados los síntomas, causando importantes pérdidas económicas en la producción ganadera.

En bovinos, *C. chauvoei* ingresa al organismo en forma esporulada desde el suelo, generalmente por vía oral (junto al alimento o agua contaminada) o mediante heridas, desde las que se disemina por vía sanguínea al resto del organismo. La mancha es considerada una infección endógena, debido a que una vez que las esporas son ingeridas por el animal permanecen latentes hasta que cualquier proceso que provoque condiciones de anaerobiosis, como la ruptura del tejido muscular, permita su germinación con la consecuente multiplicación del microorganismo y la producción de toxinas (Rood et al., 1997; Useh et al., 2003).

Las lesiones se hacen evidentes 24 horas después de la germinación de las esporas, y se caracterizan por edema, hemorragia y necrosis de las miofibrillas. Los animales afectados presentan inflamaciones crepitantes en la musculatura, particularmente en las extremidades, con una extensión rígida característica de los miembros. Finalmente, hay una bacteriemia que se da únicamente en la fase final de la enfermedad y conlleva a la muerte del animal 1 a 3 días desde la aparición de signos clínicos. En bovinos, la enfermedad afecta principalmente a individuos jóvenes de entre 6 meses y 2 años de edad (Robson, 2007).

Respuesta inmune

Existe extensa bibliografía sobre la seguridad de las vacunas contra *C. chauvoei*, sin embargo son escasos los reportes sobre los mecanismos del sistema inmune que se desencadenan ya sea frente a una infección o inducida por la vacunación contra esta especie bacteriana (Uzal, 2012). Los reportes sobre la respuesta protectora no son concluyentes, algunos autores sostienen que se caracterizaría principalmente por una respuesta temprana de IgM, que no permanecería en el tiempo, seguida de una repuesta de IgG que sería la que efectivamente conferiría la protección contra *C. chauvoei* (Chandler, 1975). Sin embargo, otros autores, sostienen que la respuesta de IgM también sería importante en la protección (Tanaka et al., 1987). Además, se ha reportado que la respuesta humoral anti flagelina y anti antígenos somáticos sería protectora frente a la vacunación y desafío (Stefanini de Guzmán et al., 1999; Tamura and Tanaka, 1984). Por otra parte, se ha reportado que la inmunidad humoral sería importante en la protección, pero no suficiente para proteger a los animales, y que

particularmente los linfocitos polimorfonucleares (PMN) estarían involucrados en la protección, debido a que los anticuerpos anti-flagelina serían anticuerpos opsonizantes, y los microorganismos opsonizados por dichos anticuerpos, serían luego eliminados por fagocitosis mediante los PMN (Tanaka et al., 1987).

Vacunas contra *C. chauvoei*

La vacunación contra *C. chauvoei* como método de prevención ha sido utilizado en todo el mundo por más de 70 años (Uzal, 2012), y junto a un adecuado manejo del ganado, constituye el principal mecanismo para controlar la mancha y las clostridiosis en general. Por esta razón las vacunas clostridiales forman parte del esquema de sanidad de los productores agropecuarios (Koval et al., 2007).

Las vacunas clostridiales pueden ser mono o multivalentes, dependiendo si contienen antígenos de una o varias especies de *Clostridium*, respectivamente. Generalmente, las vacunas presentes en el mercado son multivalentes. Éstas son de primera generación, es decir, que para su producción se utilizan métodos de detoxificación o atenuación de microorganismos virulentos. Para su preparación se utilizan antígenos en forma de toxoide o de bacterinas-toxoide. Un toxoide es un producto bacteriano que contiene la toxina, se encuentra libre de células, no presenta toxicidad (está inactivado) y sin embargo, es antigénico. Una bacterina-toxoide es una suspensión bacteriana de células, contenidas en su medio de cultivo o un concentrado del mismo, que ha sido inactivada pero que es antigénica (Madigan et al., 2004). El método más común para la generación de toxoides o bacterinas, consiste en el agregado de formol.

En particular, en la producción de vacunas anti-*C. chauvoei* se utilizan antígenos en forma de bacterinas-toxoide. La incorporación de *C. chauvoei* como bacterina se debe a que no se conocen exactamente cuáles son los componentes que confieren resistencia a los animales vacunados, y se cree que el rol predominante en la protección estaría constituido por antígenos no excretados, componentes flagelares y de la pared celular (Chandler, 1975; Chandler and Gulasekharam, 1974; Mattar et al., 2007; Ontiveros Corpus et al., 2008). Asimismo, se han caracterizado algunas toxinas producidas por *C. chauvoei* como hialuronidasas (γ), desoxirribonucleasas (β), sialidasas (o neuroaminidasas) y hemolisinas sensibles al oxígeno que jugarían un papel importante en los mecanismos patógenicos ya que podrían dañar el ADN celular, o producir la separación del intersticio celular (Useh et al., 2003; Vilei et al., 2011). En particular, recientemente se ha caracterizado una nueva toxina denominada toxina A de *C. chauvoei* (CctA), una hemolisina de 32,5 kDa perteneciente a la

superfamilia de las leucocidinas. Según lo reportado, podría tratarse del mayor factor de virulencia de *C. chauvoei*, y sería el antígeno que efectivamente conferiría protección frente a la infección por este microorganismo (Frey et al., 2012).

Los estándares y controles de producción son imprescindibles para asegurar la disponibilidad de productos uniformes de buena calidad para el uso en los programas de sanidad animal. Los métodos y requisitos exigidos para la comercialización de las vacunas pueden variar de un país a otro y se especifican en las regulaciones regionales o locales, en particular en la Farmacopea Europea (*Ph. Eu.*), en el Código Federal de Regulaciones (CFR) de Estados Unidos, y a nivel regional en la Norma MERCOSUR. Estas regulaciones exigen controles de calidad, potencia, inocuidad y esterilidad para cada lote de vacunas producido, mientras que para registrar una nueva vacuna para su comercialización se requieren además controles de eficacia. La rigurosidad de estos controles ha aumentado conforme a la expansión del sector y al aumento de las exigencias por parte de los organismos reguladores.

La eficacia está dada por el nivel de inmunidad protectora inducida en la especie de destino. Dado que las vacunas clostridiales varían en la composición de especies de *Clostridium*, y en el adyuvante, pueden diferir significativamente en su habilidad de inducir inmunidad protectora. La confirmación de la protección en vacunas veterinarias se determina usualmente mediante ensayos de vacunación y desafío en la especie de destino, como en el caso de los antígenos de *C. chauvoei* que son incluidos en las vacunas como bacterinas. Sin embargo, recientemente algunos investigadores han sugerido que la respuesta inmune humoral podría llegar a ser un buen marcador de protección para determinar la eficacia de las vacunas clostridiales (Cervino et al., 2011).

Los ensayos de protección deben ser correlacionados con ensayos de potencia. Éstos últimos se realizan como requisito para la liberación de cada lote de vacunas producido, para asegurar que se alcancen niveles de protección similares a los reportados en la especie de destino cuando se registró el producto (Romberg et al., 2012). Para *C. chauvoei*, las normas vigentes exigen que el ensayo de potencia se realice en cobayos por desafío directo con suspensión de esporas o con una cepa virulenta, donde el 87,5% de los cobayos desafiados deben resultar protegidos (*Ph.Eu.*, 2010). Este mínimo nivel aceptado en el ensayo de potencia se correlaciona con la protección demostrada en los ensayos en la especie de destino (Heldens et al., 2008).

En este contexto, nos planteamos realizar este proyecto, en colaboración con una industria nacional productora de vacunas clostridiales, lo que nos permite acceder a muestras relevantes que son difíciles de obtener dada la complejidad del trabajo con bovinos. Asimismo,

nos brinda la posibilidad de realizar estudios que permitirían avanzar en la definición de correlatos inmunológicos de protección para evaluar la eficacia de estas vacunas de manera más precisa. Como punto de partida se tomarán dos trabajos de campo en bovinos realizados por la empresa colaboradora: un ensayo de vacunación y desafío para el estudio de la protección contra este patógeno y un ensayo de vacunación donde se evaluó la duración de inmunidad. A partir de estas muestras, se analizará la respuesta inmune humoral específica a corto y largo plazo en respuesta a la vacunación y frente al desafío contra *C. chauvoei*, y se determinará su aplicabilidad en el control de la eficacia contra esta especie de *Clostridium*.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es caracterizar la respuesta inmune humoral anti-*Clostridium chauvoei* en bovinos, desencadenada por la vacunación clostridial polivalente y el desafío con *C. chauvoei* y determinar su aplicabilidad en el control de la eficacia contra esta especie de *Clostridium*.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluación de la respuesta humoral frente a vacunación y desafío contra *C. chauvoei* mediante inmunoensayo (ELISA). Análisis comparativo entre la respuesta de anticuerpos específicos y la protección frente al desafío.
- 2) Evaluación de la duración de la inmunidad humoral frente a vacunación contra *C. chauvoei* mediante inmunoensayo (ELISA).
- 3) Identificación de posibles proteínas inmunogénicas de *C. chauvoei* en bovinos, mediante Western Blot.

Materiales y métodos

ENSAYOS DE VACUNACIÓN Y DESAFÍO EN BOVINOS

Como punto de partida de este trabajo se tomó una colaboración establecida entre una empresa local productora de vacunas veterinarias y nuestro laboratorio, que nos permitió acceder a muestras de sueros bovinos obtenidos en ensayos de eficacia de vacunas policlostridiales contra *C. chauvoei* realizados por la empresa. En particular, se realizaron dos ensayos a campo: un ensayo de desafío con *C. chauvoei* y ensayo de vacunación con una vacuna policlostridial.

En los dos ensayos se utilizaron bovinos de ambos sexos de razas Aberdeen-Angus, Hereford y cruce entre ellas, de 4 a 6 meses de edad y 90 a 150 kg. Al comienzo de los ensayos, todos los animales se encontraban en buenas condiciones sanitarias y libres de parásitos. La vacuna a evaluar es una vacuna clostridial polivalente (*C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. novyi* tipo B, *C. perfringens* tipos B, C y D, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. tetani*) inactivada. La inoculación se realizó de acuerdo al esquema recomendado por el fabricante: dos dosis de 3 ml por vía subcutánea con 42 días de diferencia, y en el ensayo de vacunación una revacunación (1 dosis) anual. En ambos ensayos, el grupo control fue inoculado de la misma manera con suero fisiológico.

Ensayo de vacunación y desafío

La empresa productora de la vacuna realizó el ensayo de vacunación y desafío de bovinos contra *C. chauvoei* en colaboración con la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Seis bovinos fueron vacunados con la vacuna policlostridial a los días 0 y 42 (grupo Vacunados) y 2 bovinos con solución fisiológica (grupo Testigo). Al 56 día post vacunación (dpv) se desafió a todos los animales con una suspensión de esporas de *C. chauvoei* en 10 % CaCl₂ de 2000 DL₅₀ COBAYO por vía intramuscular en un cuarto posterior. Se evaluaron los síntomas clínicos de los animales desafiados (vacunados y testigos) desde el 56 hasta el 59 dpv y se tomaron muestras de sangre a los 0, 56, 58 y 59 dpv, tal como se muestra en el esquema de la Figura 1.

Ensayo de duración de inmunidad:

Veinte bovinos fueron distribuidos en dos grupos: 10 recibieron la vacuna policlostridial (grupo Vacunados) y 10 recibieron suero fisiológico (grupo Testigo). Se obtuvieron muestras de sueros de todos los animales a los siguientes tiempos: 0, 56, 90, 180, 365, y 400 dpv (Fig. 3).

Durante el ensayo, la empresa realizó la titulación de los anticuerpos específicos contra todas la valencias mediante la técnica de seroneutralización, salvo para *C. haemolyticum* y *C. chauvoei*.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS

Se prepararon antígenos sonicated (Ag_{SON}), *heat shock* (Ag_{HS}) y total (Ag_{TOT}) de *C. chauvoei* a partir de dos tipos de muestras: cultivos sin inactivar e inactivados (bacterina). Los antígenos preparados a partir de cultivos sin inactivar fueron utilizados para la técnica de Western Blot debido a que no presentan formol, el cual interfiere en la separación electroforética de las proteínas, generando un patrón de smear. Para la realización de la técnica ELISA se utilizaron los antígenos preparados a partir de bacterinas.

Para la preparación del Ag_{SON} se realizó una serie de sonicated en frío a una amplitud de 50 mA: 10 ciclos de 10 segundos intercalados con 10 segundos de descanso, y posteriormente 3 ciclos de 20 segundos intercalados con 10 segundos de descanso. El sonicated se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C y se seleccionó el sobrenadante. El Ag_{HS} se preparó hirviendo la muestra durante 10 minutos, y colocándola en frío inmediatamente durante 10 minutos. Luego se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm a 4°C y se seleccionó el sobrenadante. El Ag_{TOT} se preparó mediante la mezcla equivalente (volumen/volumen) de los antígenos sonicated y *heat shock*. La cuantificación proteica se determinó mediante el método de Bradford.

ELISA

La titulación de anticuerpos bovinos anti-*C. chauvoei* en ambos ensayos se realizó mediante ELISA. Brevemente, se sensibilizaron placas Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorp de 96 pocillos (Sigma) con 100 µl del Ag_{TOT} a una concentración de 50 µg/ml durante 2 horas a 37 °C. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos cada uno con una solución al 0,05% de Tween®20 (*Polyethylene glycol sorbitan monolaurate*) en Buffer fosfato salino (PBST), y posteriormente se bloqueó con 200 µl de 1% de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) en PBST (1% BSA PBST) durante 16 horas a 4 °C. Transcurrido el bloqueo, se lavaron las placas y se incubaron los sueros problema en dos diluciones (1/200 y 1/400) durante 16 horas a 4 °C, utilizando 1% BSA PBST como buffer de dilución. Luego de 3 lavados con PBST, se incubó el anticuerpo secundario anti-IgG Bovino producido en conejo y conjugado a peroxidasa (Sigma) en una dilución 1/5000 en buffer 1% BSA PBST. Para revelar se incubó 100 µl por pocillo del kit SIGMA FAST™ OPD por 15 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con 30 µl por pocillo de 3M

ácido sulfúrico (H₂SO₄). Las lecturas se realizaron a 490 nm en el lector de placas de ELISA MRX II *Microplate reader* (DYNEX Technologies).

El título de anticuerpos se determinó como:

$$\text{Título de anticuerpos} = \frac{\text{O.D muestra}}{\text{O.D control positivo} - \text{O.D control negativo}}$$

El control positivo corresponde al pool de sueros de los animales vacunados del 56 dpv, y el control negativo corresponde al pool de sueros de los animales vacunados del 0 dpv.

Se estableció el nivel basal de anticuerpos en la población, determinando la línea de base (“*cut-off*”) de manera de detectar los aumentos inducidos específicamente por la vacunación. Para esto, se titularon los sueros de los animales de ambos ensayos (n=28) previo a la vacunación (0 dpv). Una vez obtenidos estos resultados, se definió el “*cut-off*” como el promedio de los títulos más 3 desvíos estándar (3DS) (Steinman et al., 2006).

WESTERN BLOT

Para analizar el patrón proteico de las muestras se realizaron ensayos de *Western Blot*. Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida [solución al 30 % de acrilamida/bisacrilamida (29:1)] (Sigma) al 12 % de 1,5 mm de espesor y 15 carriles, según protocolo SDS-PAGE (Lane, 1988). En cada carril se sembraron 15 µg de Ag_{TOT} preparado a partir del cultivo activo de *C. chauvoei* en buffer de muestra (0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,02 % azul de bromofenol, pH 6,8) y 5 % β-mercaptoetanol. La corrida se realizó con buffer Tris-Glicina de pH 8,3 a voltaje constante (150 Volts).

Los antígenos separados electroforéticamente fueron transferidos a una membrana de polivinilidenedifloride (PVDF) (Immobilon P transfer membrane, Millipore Co) a 80 mA durante 16 horas a 4°C, utilizando el buffer 25 mM Tris 192mM glicina y 20 % metanol. Finalizada la transferencia, se corroboró la presencia de proteínas en la membrana mediante tinción transitoria con Rojo de Ponceau. Las membranas fueron fraccionadas en tiras y se bloquearon con 1% BSA PBST durante 90 minutos a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el bloqueo, se lavaron 10 veces con agitación por 2 minutos con 0,1 % Tween®20 en PBS. Los sueros problema fueron incubados, con agitación en una dilución 1/100 en buffer 1% BSA PBST durante 45 minutos a 37 °C. Para la evaluación de los sueros de los animales Testigo, se realizó un Pool por ensayo y por día, mientras que los sueros de los animales vacunados se evaluaron individualmente. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-Bovine conjugado

a peroxidasa (Sigma) en una dilución 1/7500 durante 1 hora a 37 °C. Las membranas fueron lavadas y se revelaron por quimioluminiscencia con el kit Amersham ECL™ Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare). La captación de la quimioluminiscencia se realizó con el sistema de captación de imágenes G-box (Syngene).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar las diferencias estadísticas de los datos obtenidos de la titulación de sueros se utilizó del programa Graph Pad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, San Diego California, USA). Por tratarse de datos no paramétricos, se utilizó el Test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn.

Resultados

A) Optimización de ELISA específico contra *C. chauvoei*

Con el fin de analizar la respuesta inmune humoral específica contra *C. chauvoei* se realizó la optimización de un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) específico. Para la optimización se evaluaron las diferentes etapas de la técnica en distintas condiciones, utilizando pools de sueros de animales vacunados extraídos pre y post-vacunación (0 y 56 dpv) como controles negativo y positivo, respectivamente. La selección de la condición óptima para el desarrollo del ELISA se basó en encontrar las condiciones que presentaban mayores diferencias de densidad óptica (OD) entre los controles positivo y negativo, y menores valores de OD para los controles sin suero (control de Blanco).

Para obtener el antígeno de sensibilización se evaluaron diferentes lotes industriales de bacterinas, cedidas por la empresa productora, de las cuales se eligieron tres (Lotes: 1, 2 y 3) que presentaban mayores valores de potencia y crecimiento bacteriano (datos suministrados por la empresa). A partir de estos lotes se prepararon antígenos Ag_{HS} , Ag_{SON} y Ag_{TOT} , obteniéndose las proteínas adheridas a la pared celular con el primero y todas las proteínas de la célula en los otros dos tal como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados de la cuantificación proteica se detallan en la **Tabla 1**.

Bacterina	Antígeno	Concentración proteínas ($\mu\text{m/ml}$)
1	1 _{HS}	2714
	1 _{SON}	2200
	1 _{TOT}	2457
2	2 _{HS}	4712
	2 _{SON}	3555
	2 _{TOT}	4133
3	3 _{HS}	4382
	3 _{SON}	4227
	3 _{TOT}	4305

Tabla 1. Concentración proteica de los antígenos (Ag_{HS} , Ag_{SON} y Ag_{TOT}) de *C. chauvoei* preparados a partir de 3 lotes industriales de bacterinas.

La bacteria 1 presenta menor rendimiento proteico que las bacterinas 2 y 3, las cuales presentan buenas concentraciones proteicas y son similares entre sí.

Para la sensibilización, se probaron los tres tipos de antígenos a 4 concentraciones diferentes (10, 20, 50, y 100 µg/ml). Con Ag_{son} y Ag_{TOT} se obtuvieron, para todas las concentraciones, valores de OD similares del control positivo y mayores que utilizando el Ag_{HS}. Por ello, se resolvió utilizar Ag_{TOT}, incluyendo proteínas de ambos antígenos. Se evaluaron dos condiciones de sensibilización: 2 horas a 37 °C y 16 horas a 4 °C, y se seleccionó una sensibilización de 2 horas a 37 °C con el antígeno 3_{Tot} a una concentración de 50 µg/ml.

Se probaron distintos sistemas de buffer bloqueo y diluyente: 1 y 3% BSA en buffer PBST, 0,2 % Tween®20 en PBS, y leche descremada al 5 y 0,5 % en PBST. Cada sistema evaluado se incubó en dos condiciones, 16 horas a 4 °C y 1 hora a 37 °C y el sistema elegido fue el de 1% de BSA PBST durante 1 hora a 37 °C.

Seis sueros del 0 y 56 dpv fueron evaluados individualmente en 8 diluciones seriadas al medio a partir de 1/100 para definir qué dilución se encuentra dentro del rango de linealidad de manera de asegurarnos que el sistema no se encuentra saturado. Se evaluaron 2 condiciones de incubación, 2 horas a 37 °C y 16 horas a 4°C. Las mejores condiciones se obtuvieron con esta última, y las diluciones elegidas para testear todos los sueros fueron 1/200 y 1/400.

Para cuantificar, se evaluó la posibilidad de realizar una curva estándar con el pool de sueros positivos, dentro de la cual se interpolarían los datos, sin embargo esto no fue posible debido a que la linealidad se obtenía con bajos valores de OD. En función de ello, se utilizó una nueva estrategia de cuantificación donde se definen las unidades arbitrarias como el valor de OD problema sobre la diferencia entre el valor de OD positivo y el negativo, multiplicado por 10 (ver en Materiales y Métodos).

B) Evaluación de la respuesta humoral frente a vacunación y desafío contra *C. chauvoei*. Análisis comparativo entre la respuesta de anticuerpos y la protección frente al desafío.

El ensayo vacunación y desafío fue descrito en Materiales y Métodos, y el esquema se muestra en la Fig. 1. Los datos suministrados por la empresa que realizó el ensayo indican que todos los animales vacunados (n=6) sobrevivieron al desafío sin desarrollar la enfermedad. Los animales del grupo control (n=2) murieron a causa de una infección generalizada provocada por *C. chauvoei*. Uno de ellos, murió al 57 dpv (1 día post desafío), y el restante debió ser sacrificado al día 59 debido al avanzado estado de su enfermedad inducida por la infección.

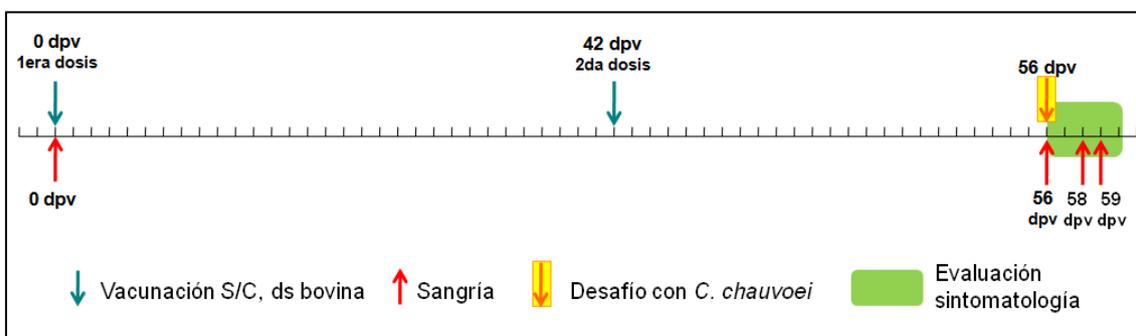


Figura 1: Esquema del ensayo de vacunación y desafío contra *C. chauvoei*. Las flechas azules indican los tiempos de vacunación, y las rojas indican los diferentes tiempos de sangría (0, 56, 58 y 59 dpv). El desafío con una suspensión de esporas de *C. chauvoei* al 56 dpv se señala con la flecha roja resaltada en amarillo. A los 56, 58 y 59 dpv se evaluaron además los síntomas clínicos.

Para cuantificar el título de anticuerpos anti-*C. chauvoei* en los sueros bovinos se utilizó el ELISA optimizado previamente. El valor del nivel basal de anticuerpos en la población (*cut off*) se determinó tal como se explica en Materiales y Métodos y su valor fue de 4,422 UA.

Los animales vacunados exhibieron un aumento en el título de anticuerpos en respuesta a las dos inmunizaciones (Fig. 2), aunque no fue significativo. Cinco de los seis bovinos vacunados, al 56 dpv, presentaron niveles de anticuerpos por encima del nivel de *cut-off*. El animal que no sobrepasó dicho nivel igualmente aumentó su título. Al 0 dpv, todos los animales presentaban títulos menores al nivel basal, salvo un animal del grupo que luego recibió la vacuna. El título de anticuerpos de los animales del grupo Testigo se mantuvo por debajo del nivel de *cut off* a lo largo de todo el ensayo. Luego del desafío no se observaron diferencias significativas en la respuesta del grupo vacunado, aunque se observó una leve disminución al 58 dpv (2 días post-desafío).

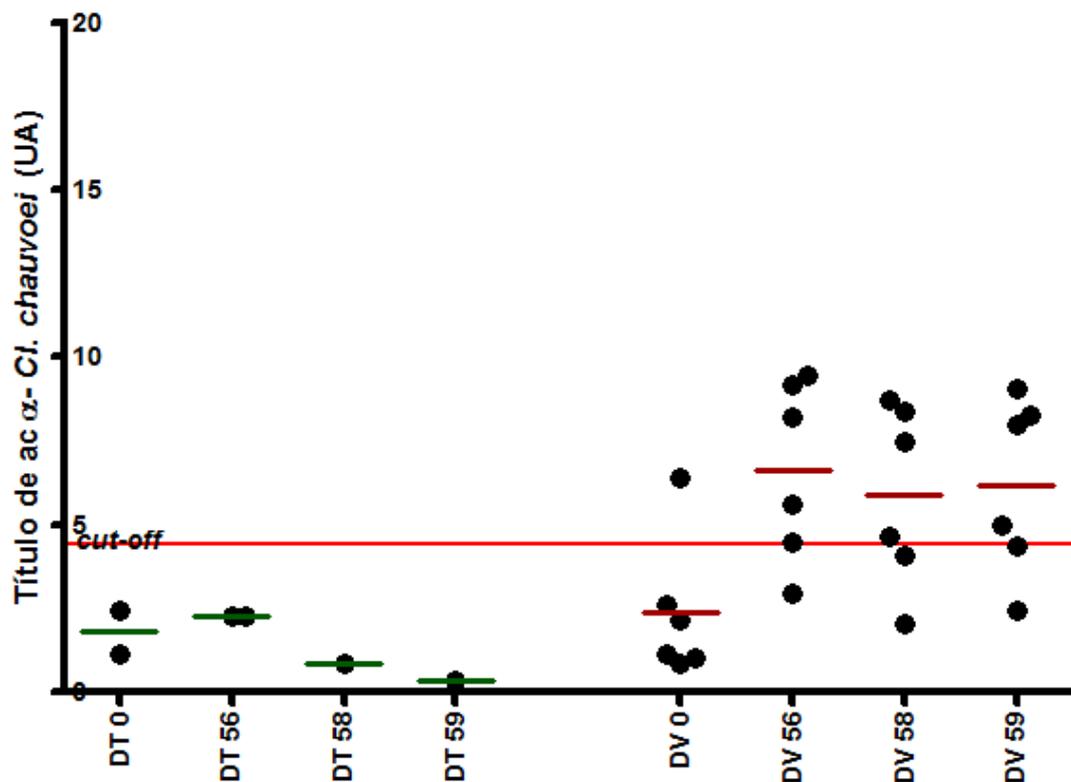


Figura 2 Título de anticuerpos IgG séricos anti *C. chauvoei* en bovinos en respuesta a vacunación y desafío. Dilución de sueros 1/200. Los resultados son expresados en UA para el grupo de animales testigo (DT) y vacunados (DV) a los diferentes dpv. *Cut off*: 4,422 UA. *: indica diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$).

Como parte del ensayo de vacunación y desafío contra *C. chauvoei*, se evaluaron los síntomas clínicos de los animales durante el ensayo de desafío (Fig. 1). Para ello, diseñaron un sistema para asignar un puntaje según la sintomatología clínica desarrollada que tenía un score máximo de 20 (considerando el animal en estadio terminal de la enfermedad causada por la infección). Para asignar este puntaje se evaluó: temperatura, frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), respuesta a estímulos (sensorio), estado de la mucosa ocular, tiempo de llenado capilar (TLLC), calor, dolor, tumor, y edema de la reacción local, y la pérdida de la función del miembro inoculado.

Nº animal	0 dpv		56 dpv		58 dpv		59 dpv	
	Anticuerpos (UA)	Puntaje						
DV-01	1.061	0	6.099	0	5.135	2	4.670	2
DV-02	3.274	0	8.744	0	8.303	3	7.643	0
DV-03	1.435	0	5.082	0	4.640	1	4.234	1
DV-04	7.504	0	8.909	0	8.529	3	8.363	1
DV-05	1.495	0	3.453	0	2.357	8	2.733	1
DV-06	2.212	0	7.309	0	6.141	1	6.877	1
DT-11	2.945	0	2.601	0	(*)	16	☠	☠
DT-12	1.480	0	2.646	0	1.051	14	0.571	16

Tabla 2: Comparación entre el título de anticuerpos anti-*C. chauvoei* y el puntaje de sintomatología clínica. El diseño y evaluación de los animales para asignación de este puntaje fue realizado por Dr. Martín Breijo, Dr. Pablo Alonzo y MSc. Rafael Pellegrino. Los animales del grupo testigo (DT) se muestran en las filas grises, mientras que los animales del grupo vacunado (DV) se muestran en las filas blancas. (*): no se dispone de muestra. ☠: Indica que el animal ha muerto y por eso no hay muestra disponible. Valor de *cut off*: 4,422 UA.

Con los resultados de respuesta humoral específica contra *C. chauvoei* y los datos suministrados de la sintomatología frente al desafío, se realizó un análisis comparativo con el fin de definir si una buena respuesta de anticuerpos es un buen indicador de la protección de los animales contra *C. chauvoei*.

Al 56 dpv, previo al desafío, los animales no presentaban síntomas, y como se mencionó anteriormente, el título de anticuerpos era superior al *cut off* en el grupo vacunado (Tabla 2). Al 58 dpv (48 horas post-desafío), los animales de este grupo presentan valores bajos (1 a 3 puntos), salvo en el caso del animal DV-05, que obtuvo un valor de 8 puntos. No obstante, al día siguiente (59 dpv), el título de anticuerpos de este animal se mantiene estable, pero sus síntomas disminuyen drásticamente, llegando a valores similares al del resto de los animales del grupo vacunado. Los animales testigo, en cambio, presentaron valores de sintomatología altos respecto a los vacunados desde el 58 dpv (14 a 16 puntos).

Dentro del grupo de vacunados, al 58 dpv, se observa que los animales que alcanzaron valores de 3 puntos son los que presentan mayor título de anticuerpos (animales DV-02 y DV-04). Uno de ellos, el animal DV-02, es el que más rápidamente se recupera, alcanzando un puntaje de 0 al 59 dpv. Por el contrario, en los testigos los síntomas se agudizan, al punto que al 58 dpv uno de ellos ha muerto debido a una infección generalizada por *C. chauvoei* y el otro fue sacrificado al día siguiente, debido a la avanzada infección.

C) Evaluación de la duración de la inmunidad humoral frente a vacunación contra *C. chauvoei*

El ensayo realizado por la empresa productora de la vacuna fue descrito en Materiales y Métodos, y el esquema se muestra en la Fig. 3.

La empresa productora realizó ensayos de seroneutralización contra todos los antígenos incorporados en la vacuna en forma de toxoide durante todo el experimento. Los datos suministrados señalan que animales vacunados respondieron tanto a la vacunación como a la revacunación, generando un alto título de anticuerpos al 56 y 400 dpv respectivamente. En los animales testigos no se induce respuesta (datos no mostrados).

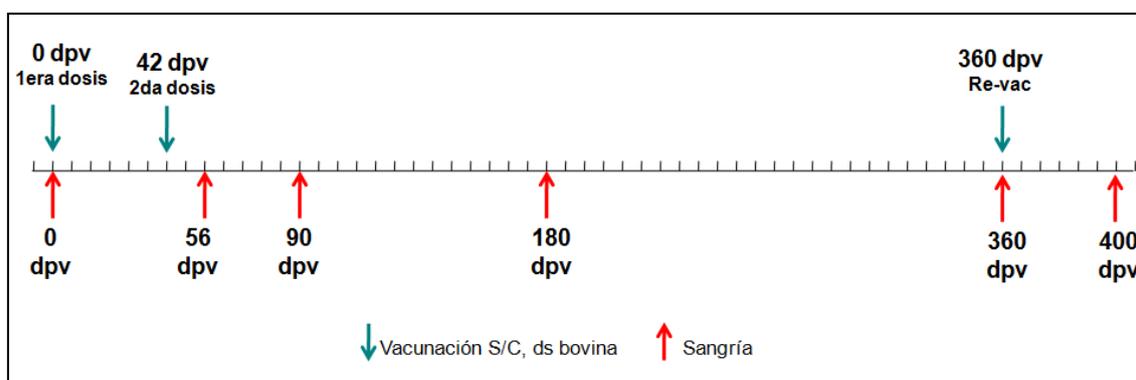


Figura 3: Esquema de ensayo de duración de inmunidad contra *C. chauvoei* en bovinos. Los animales fueron inoculados, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con dos dosis de la misma vacuna policlostridial utilizada en el ensayo de vacunación y desafío (flechas azules). Las flechas rojas indican los tiempos de sangrado, que se realizaron por punción de la vena yugular en los días: 0, 56, 90, 180, 360 y 400 dpv.

Mediante la titulación realizada, se puede inferir que los animales vacunados respondieron a la vacunación, ya que al 56 dpv se observa un alto título de anticuerpos, superior al valor de *cut off*, en este grupo, y no así en el grupo testigo (Fig. 4). Este aumento es significativo respecto al 0 dpv de su grupo y al 0 y 56 dpv del grupo testigo. No obstante, este título disminuye rápidamente, y al 90 dpv, es similar al valor de *cut off*. Luego de la revacunación anual, al 400 dpv, se observa que el grupo vacunado indujo una respuesta frente a esta segunda inmunización, característica de un booster, ya que en términos absolutos, esta respuesta es mayor a la respuesta mostrada al 56 dpv. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos, no hay diferencias significativas respecto al 360 dpv del grupo vacunados. Además, algunos individuos del grupo testigo también inducen una respuesta. No se observan diferencias significativas entre los grupos al 400 dpv.

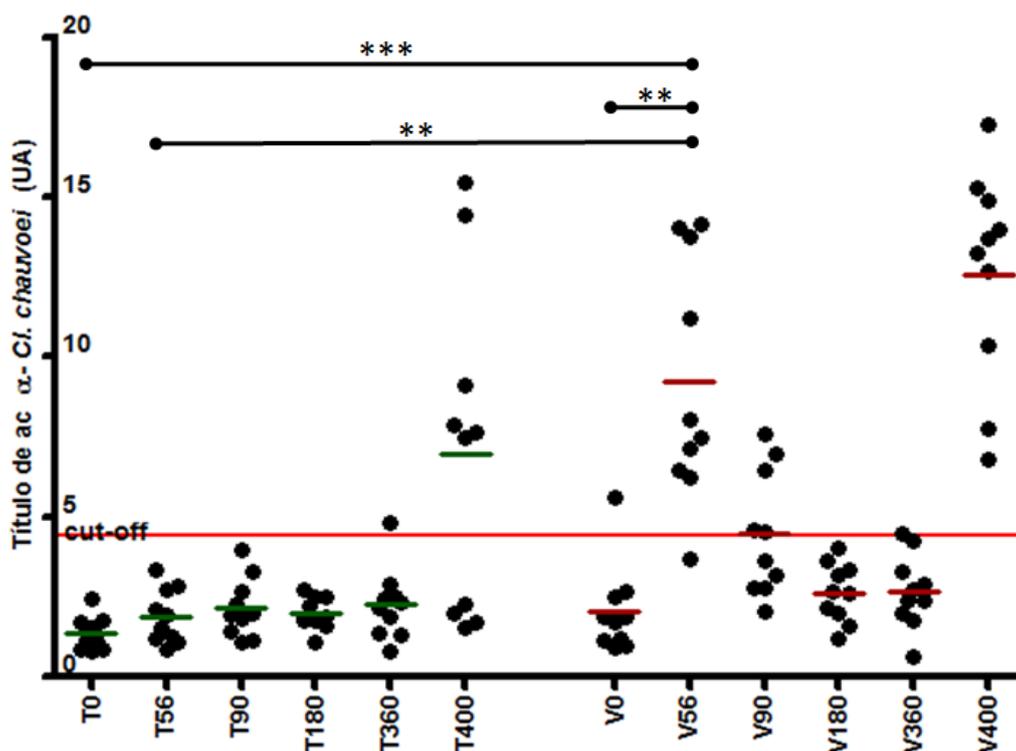


Figura 4. Título de anticuerpos IgG séricos anti *C. chauvoei* en bovinos en respuesta a la vacunación y revacunación anual, en el ensayo de duración de la inmunidad. Dilución de sueros 1/200. Los resultados son expresados en UA para el grupo de animales testigo (T) y vacunados (V) a los diferentes dpv. Valor de *cut off*: 4,422 UA. *: indica diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$).

D) Identificación de posibles proteínas inmunogénicas de *C. chauvoei* mediante Western Blot.

Con el fin de identificar posibles proteínas inmunogénicas de *C. chauvoei* se realizaron ensayos de Western Blot. Para ello, se prepararon Ag_{HS} , Ag_{SON} y Ag_{TOT} a partir de un lote de cultivo sin inactivar de *C. chauvoei* como se describió en Materiales y Métodos. Las tres preparaciones fueron cuantificadas por el método de Bradford y evaluadas por SDS-PAGE con la finalidad de definir cuál preparación sería utilizada para los ensayos de Western Blot. El Ag_{HS} contenía una concentración proteica de 125 $\mu\text{g/ml}$, el Ag_{SON} de 739 $\mu\text{g/ml}$, y el Ag_{TOT} de 432 $\mu\text{g/ml}$. Las evaluaciones por SDS-PAGE se realizaron comparando cantidades equivalentes de Ag_{SON} y Ag_{TOT} (10 y 20 $\mu\text{g/well}$), sin embargo, no fue posible sembrar más de 5 $\mu\text{g/well}$ del Ag_{HS} , debido a que por su baja concentración, se debía agregar un volumen mayor al permitido por el gel. Al comparar sus perfiles proteicos observamos que en el Ag_{HS} no se veían bandas y en el Ag_{SON} y

Ag_{TOT} si, por lo cual se decidió utilizar el Ag_{TOT}, que si bien presentaba una menor concentración que el Ag_{SON}, contiene antígenos de ambas preparaciones.

El ensayo de Western Blot se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. Se evaluaron 6 sueros de animales vacunados al 0 y 56 dpv. Para evaluar los animales testigos (Tes) se realizó un pool para cada día evaluado (Fig. 5).

En los sueros de los animales vacunados, se observa el reconocimiento específico de un doblete de bandas mayor a 170 kDa únicamente al 56 dpv en todos los animales vacunados (Fig. 5). Este doblete no se observa al 0 dpv de los animales vacunados ni en el pool de testigos. También se observa el reconocimiento diferencial de una banda de 50 kDa que es reconocida más intensamente por los sueros del 56 dpv de los animales vacunados que al 0 dpv de ese grupo y que de los testigos. Por otra parte, en los animales vacunados 03, 04 y 06 se observa una banda de aproximadamente 170 kDa que es reconocida al 56 dpv y no al 0 dpv.

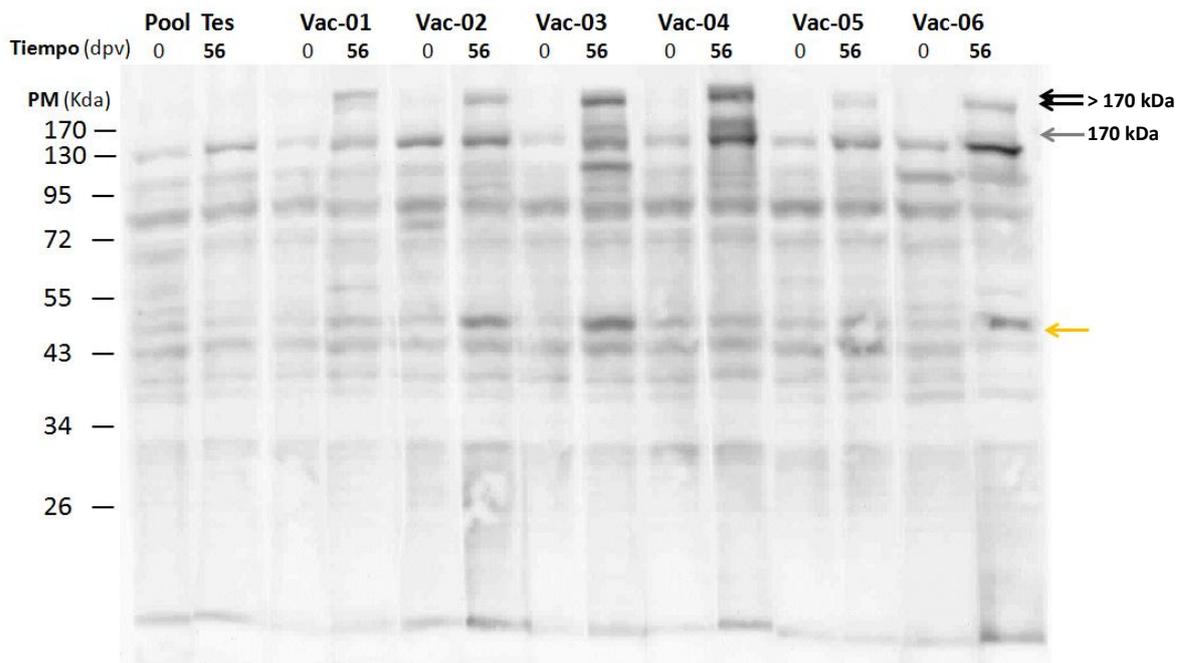


Figura 5: Componentes antigénicos detectados por sueros de animales vacunados y testigos a 0 y 56 dpv por Western Blot. De izquierda a derecha, Carriles 1 y 2: Pool de sueros de animales Testigo (Pool Tes); Carriles 3 y 4: animal vacunado 1 (Vac-01); Carriles 5 y 6: animal vacunado 2 (Vac-02); Carriles 7 y 8: animal vacunado 3 (Vac-03); Carriles 9 y 10: animal vacunado 4 (Vac-04); Carriles 11 y 12: animal vacunado 5 (Vac-05); Carriles 13 y 14: animal vacunado 6 (Vac-06).

Discusión y Conclusiones

La prevención mediante vacunas continúa siendo el principal mecanismo de protección frente a las clostridiosis. Sin embargo, las vacunas disponibles son mezclas complejas de antígenos, en particular, *C. chauvoei* es incorporado a las vacunas en forma de bacterina, debido a que aún no ha sido posible establecer cuáles son los antígenos y los mecanismos inmunológicos que confieren protección. Aunque hoy en día las vacunas son efectivas, resulta de especial interés comprender estos dos aspectos, de manera de optimizar los productos existentes, y poder desarrollar nuevos y mejores productos. En tal sentido, nos propusimos caracterizar la respuesta inmune humoral anti-*Clostridium chauvoei* en bovinos, desencadenada por la vacunación clostridial polivalente y el desafío con *C. chauvoei* y determinar su aplicabilidad en el control de la eficacia contra esta especie de *Clostridium*.

Para ello se optimizó un ensayo de ELISA, cuya puesta a punto presentó grandes dificultades debido a problemas de inespecificidad y de saturación del sistema a bajos valores de OD. Sin embargo, finalmente fue posible obtener un sistema que permite cuantificar específicamente el título de anticuerpos anti- *C. chauvoei* en suero bovino.

Uno de los ensayos realizados por la empresa productora fue el estudio de la protección frente al desafío contra *C. chauvoei* en bovinos con el fin de evaluar la eficacia de la vacuna para esta valencia. De acuerdo a la información brindada por la empresa, el ensayo resultó satisfactorio, ya que los animales vacunados fueron protegidos frente al desafío, mientras que los testigos no. Dentro de este contexto, nuestros resultados indicaron que el título de anticuerpos anti-*C. chauvoei* del grupo vacunado aumentó luego de las dos inmunizaciones, pero sin embargo este aumento no fue significativo respecto a su 0 dpv y al grupo testigo, probablemente debido a la dispersión mostrada por los datos y al bajo número de animales control. Los bovinos del grupo testigo mostraron un bajo título de anticuerpos a lo largo de todo el estudio.

En particular, uno de los animales del grupo vacunado presentaba, al inicio del ensayo (0 dpv), un título de anticuerpos específicos mayor al valor de *cut off*, sugiriendo que este animal podría haber estado expuesto a antígenos de *C. chauvoei* previamente.

Al 58 dpv, dos días después del desafío, se observa un leve descenso general de título de anticuerpos anti-*C. chauvoei*. Esto podría deberse a que parte de esos anticuerpos estarían actuando en defensa a la infección. Según lo reportado por Tamura y Tanaka (1984) los anticuerpos anti-flagelina actuarían como anticuerpos opsonizantes facilitando la fagocitosis por parte de los leucocitos polimorfonucleares.

Al comparar la sintomatología con la respuesta humoral, se evidencia que los animales del grupo vacunado cuyo título era superior al *cut off* al momento del desafío (56 dpv) desarrollaron síntomas leves, mientras que el animal vacunado con bajo título de anticuerpos desarrolló una mayor sintomatología en los primeros días pos-desafío. Los animales testigo desarrollaron síntomas agudos e irreversibles. Tres días post desafío (59 dpv) los animales vacunados lograron recuperarse presentando síntomas leves o nulos, incluso el animal cuyo título de anticuerpos era menor al *cut off*, mientras que los testigos no lograron sobrevivir a la enfermedad. De estos resultados preliminares surge que aunque es posible visualizar cierta asociación entre la respuesta humoral y la protección inducida por la vacunación de los animales frente al desafío, es claro también que un animal con bajos niveles de anticuerpos muestra cierta protección, por lo que podría sugerirse que además de la respuesta humoral, hay otros mecanismos del sistema inmunológico que estarían involucrados en la protección frente a esta infección.

Para la vacuna clostridial polivalente evaluada en el ensayo de desafío, las recomendaciones del fabricante establecen que se debe realizar una revacunación anual. En función de esto, la empresa productora realizó un ensayo de evaluación de la inmunidad a largo plazo (a un año), de manera de evaluar la inmunidad humoral previo a la revacunación (360 dpv), y post-revacunación (400 dpv). Para ello, la empresa productora evaluó mediante seroneutralización la respuesta humoral (anticuerpos neutralizantes) generada por las valencias incluidas a la vacuna en forma de toxoide. Sin embargo, la evaluación mediante seroneutralización para *C. chauvoei* no es posible debido a que éste es incluido en la vacuna en forma de bacterina. Como parte de este trabajo se analizó la respuesta humoral frente a *C. chauvoei* mediante ELISA y los resultados mostraron que los animales respondieron significativamente a la vacunación, induciendo un alto título de anticuerpos luego de las dos primeras inmunizaciones. Este incremento en el título de anticuerpos es comparable a lo reportado en investigaciones previas (Brown et al., 1976; Cervino et al., 2011; Troxel et al., 1997). Luego de este pico de anticuerpos, el título desciende, alcanzando valores similares al *cut off* al 90 dpv, y valores por debajo de éste al 360 dpv.

Luego del *booster* anual, se observa un aumento del título de anticuerpos superior al inducido luego de las 2 primeras inmunizaciones, aunque en las condiciones del experimento realizado, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No se han encontrado reportes que estudien la inmunidad a tan largo plazo. El aumento pronunciado característico de un *booster* observado al 400 dpv, sugeriría que los animales vacunados han producido células B de memoria, que al ser estimuladas con el antígeno (revacunación) desencadenaría una fuerte

respuesta humoral, es decir, un título de anticuerpos anti-*C. chauvoei* mayor al desarrollado por las dos primeras inoculaciones. Sin embargo, se requerirían estudios más exhaustivos para poder caracterizar el tipo de respuesta inmunológica inducida contra esta bacteria.

Por otra parte, en el grupo testigo también se observa que algunos animales presentan un aumento del título por encima del nivel de *cut off* luego del *booster*. Se descartaría que este aumento pudiera deberse a un error de vacunación debido a que el título de anticuerpos para las restantes valencias que contenía la vacuna se mantuvieron bajos (datos de seroneutralización suministrados por la empresa). El alto título en este grupo podría deberse a una exposición a antígenos de *C. chauvoei* u otra especie que induzca una respuesta cruzada de anticuerpos, dado que los animales se encontraban a campo durante todo el ensayo.

La gran variabilidad observada en la respuesta humoral, evidenciada por la dispersión en los títulos de anticuerpos anti-*C. chauvoei*, podría explicarse por el hecho de que los animales fueron mantenidos a campo y presentaban diferente raza y sexo. Aunque sería posible realizar ensayos con animales en ambientes más controlados y contenidos, es importante poder evaluar la respuesta en las especies de destino mantenidos a campo, ya que es allí donde será utilizada la vacuna.

Como se mencionó anteriormente, el antígeno contra *C. chauvoei* se ha incorporado en las vacunas clostridiales por más de 70 años, sin embargo, su incorporación continua siendo en forma de bacterina, debido a que aún no se han caracterizado cuáles son los antígenos protectivos de este microorganismo. La identificación y caracterización de estos antígenos resulta fundamental para poder diseñar productos que generen una respuesta inmune específica, por lo que en este trabajo nos planteamos identificar posibles proteínas inmunogénicas de *C. chauvoei*. Para ello se evaluó el patrón de reconocimiento antigénico de los sueros provenientes de animales vacunados y testigos pre y post vacunación (0 y 56 dpv), y los resultados mostraron un reconocimiento diferencial en respuesta a la vacunación. En particular, se observa únicamente en los sueros del 56 dpv de los animales vacunados un doblete de bandas mayor a 170 kDa, para el que no se encontraron reportes bibliográficos que sugiriesen de que proteínas podría tratarse. Además, surge una banda de entre 43 y 55 kDa reconocida por los sueros de los animales vacunados extraídos al 56 dpv; y según la literatura, podría corresponder a monómeros de flagelina, que en el caso de *C. chauvoei* tiene un peso molecular de 46 kDa y su composición aminoacídica sería similar a la flagelina de *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Kojima et al., 1999). La flagelina de *C. chauvoei* ha sido reportada como inmunogénica, aunque no necesariamente capaz de generar inmunidad protectora en modelo murino (Chandler and Gulasekharan, 1974), aunque su rol en la

protección no ha sido descrito en bovinos. Por otra parte, se detectó una banda de 130 kDa reconocida más intensamente por algunos de los sueros del 56 dpv de los animales vacunados, que podría corresponder a un antígeno excretado de *C. chauvoei* reportado pero aún no caracterizado (Mattar et al., 2007). Nuestros resultados no evidencian un reconocimiento de una banda de 32,3 kDa que pudiera corresponder a la CctA reportada por Frey y colaboradores (2012) como el principal factor de virulencia de *C. chauvoei*.

En resumen, nuestro trabajo estuvo dividido en dos grandes bloques, por un lado la evaluación de la respuesta humoral, y por otro la identificación de posibles proteínas inmunogénicas. En relación a esto último, se detectó un patrón de reconocimiento diferencial de bandas, que podrían corresponder con proteínas candidatas a antígenos involucrados en la inmunogenicidad de *C. chauvoei*. Algunas de las bandas observadas podrían correlacionarse con proteínas reportadas en la literatura, aunque para otras no se han encontrado reportes y para su caracterización se requiere el estudio del proteoma de *C. chauvoei*. Para realizar el análisis de la respuesta humoral se optimizó un ELISA específico que permitió titular la respuesta humoral frente a la bacterina de *C. chauvoei* inducida por la vacunación en bovinos a campo. Además, fue posible confirmar que los animales respondieron a la vacunación y revacunación, exhibiendo un alto título de anticuerpos luego de las dos primeras inmunizaciones y de la revacunación anual. A partir de ello podría sugerirse que los animales generaron memoria inmunológica luego de las dos primeras inoculaciones, aunque se sugiere realizar estudios adicionales que permitan confirmarlo. Por otro lado, a partir de estos resultados preliminares surge que si bien existe una cierta correlación entre la respuesta humoral y la protección inducida por la vacunación de los animales frente al desafío, ésta no explica todas las situaciones visualizadas. A partir de ello podría sugerirse que el análisis de la respuesta humoral por sí sola no sería suficiente para la evaluación de la eficacia, debido a que podrían estar involucrados otros mecanismos del sistema inmunológico en la protección frente a *C. chauvoei*. Sin embargo, se requieren estudios más exhaustivos sobre los otros brazos de la respuesta inmune para confirmar esta hipótesis.

Perspectivas

Este trabajo intentó contribuir en la caracterización de la respuesta inmune humoral anti-*C. chauvoei* en bovinos asociada a la vacunación, debido a que no se conocen cuales son los mecanismos protectivos contra esta bacteria. En este sentido, una buena aproximación para poder ampliar este trabajo y estudiar también la respuesta celular sería analizar la fluctuación de poblaciones celulares (células T CD4+, CD8+, células B y granulocitos) a nivel periférico por citometría de flujo en animales testigos, vacunados y desafiados. Además, estudiar en estos animales, la respuesta de memoria evaluando por un lado la capacidad de las poblaciones linfocitarias para proliferar diferencial y específicamente, y por otro, analizando el perfil de expresión de citoquinas bovinas asociadas a Th1, Th2, Th17 y regulatorias en respuesta a antígenos específicos en sangre periférica por RT-qPCR.

Otra interrogante surge en relación a cuáles son los antígenos protectivos de *C. chauvoei*. En particular, en este trabajo se evaluó el patrón de reconocimiento de proteínas inmunogénicas en respuesta a la vacunación. Dichas proteínas no necesariamente podrían conferir protección contra la infección por *C. chauvoei*, por lo que se propone realizar un ensayo de *Western Blot* con los sueros de los animales del ensayo de desafío, extraídos 24 y 48 horas después de éste. Además se propone evaluar el patrón de reconocimiento de estos sueros mediante un ensayo de electroforesis en dos dimensiones (2D) seguida de un *Western Blot*. Para poder caracterizar las proteínas inmunogénicas y posiblemente protectoras, se propone realizar espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Agradecimientos

A mis padres, Elena, Carlos y Janette, por su apoyo, confianza, paciencia, franqueza y cariño incondicional.

A Andrea, mi tutor(a), porque durante el largo tiempo que duró este trabajo, ambas atravesamos arduas situaciones personales, y que aún así, hasta en los momentos más difíciles, supo dirigir este proyecto, y pulirlo con paciencia y tenacidad para que pudiera ser expresado en términos científicamente correctos.

A Alejandro, mi co-tutor, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo en el departamento que dirige. Por sus consejos y observaciones técnicas.

A todos mis compañeros del LVR, por su alboroto y buen humor, pero sobre todo, por su solidaridad sin excusas desde el primer día.

A Jorge Travers y Rafael Pellegrino, que fueron los ideólogos de lo que luego se transformaría en este trabajo. Por sus consejos, apoyo y confianza.

A Luján Facal y Alejandra Carlos, por sus consejos, paciencia y apoyo.

A Merial S.A. por haber cedido gentilmente insumos para la realización de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología de Merial S.A., por su ayuda y buena disposición.

A Dr. Martin Breijo y Dr. Pablo Alonzo por su participación este ensayo, y por haber hecho posible la obtención de muestras para la realización en este trabajo.

A la ANII por la financiación de este proyecto.

Bibliografía

- Brown, K.K., Parizek, R.E., Stewart, R.C., 1976, Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. *Vet Med Small Anim Clin* 71, 1717-1722.
- Cervino, M., Figueras, L., Martin, S., Elvira, L., Callus, M., Dowlut, S., Engelhard, I., Calvo, E., Makoschey, B., 2011, Specific humoral response and effect on rectal temperature of two clostridial vaccines in lambs. *Vet Rec* 168, 458.
- Chabalgoity, J.A., 2005, Paving the way for the introduction of new vaccines into developing countries. *Expert Rev Vaccines* 4, 147-150.
- Chandler, H.M., 1975, Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic, and protective antigens of a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. *Infect Immun* 12, 143-147.
- Chandler, H.M., Gulasekharan, J., 1974, The protective antigen of a highly immunogenic strain of *Clostridium chauvoei* including an evaluation of its flagella as a protective antigen. *J Gen Microbiol* 84, 128-134.
- Frey, J., Johansson, A., Burki, S., Vilei, E.M., Redhead, K., 2012, Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. *Vaccine* 30, 5500-5505.
- Heldens, J.G., Patel, J.R., Chanter, N., Ten Thij, G.J., Gravendijck, M., Schijns, V.E., Langen, A., Schetters, T.P., 2008, Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *Vet J* 178, 7-20.
- Hirsh, D.M., J.; Walker, R., 2004, *Veterinary Microbiology*, Second edition Edition. Blackwell Publishing.
- Kojima, A., Amimoto, K., Ohgitani, T., Tamura, Y., 1999, Characterization of flagellin from *Clostridium chauvoei*. *Veterinary microbiology*, 231 - 237.
- Koval, A.A., Vena, M.M., Margueritte, J.A., 2007, Mancha de los bovinos, conceptos básicos para su prevención. *Veterinaria Argentina* 24, 113 - 119.
- Lane, E.H.D., 1988, *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2004, *Brock. Biología de los microorganismos*, décima Edition. Pearson Educación S.A., Madrid.
- Mattar, M.A., Cortinas, T.I., Stefanini, A.M., 2007, Extracellular proteins of *Clostridium chauvoei* are protective in a mouse model. *Acta Vet Hung* 55, 159-170.
- OIE, 2008, *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Organización Mundial de Sanidad Animal.
- Ontiveros Corpus, M.L., Hernández Andrade, L., López Mendez, J., Gutierrez, V.T., 2008, Prevention of Blackleg by an Immunogen of *Clostridium chauvoei*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 303 - 305.
- Ph.Eu. 2010. *European Pharmacopoeia*.
- Robson, S., 2007, Clostridial diseases in cattle. *Primefacts* 440.
- Romberg, J., Lang, S., Balks, E., Kamphuis, E., Duchow, K., Loos, D., Rau, H., Motitschke, A., Jungback, C., 2012, Potency testing of veterinary vaccines: the way from in vivo to in vitro. *Biologicals* 40, 100-106.
- Rood, J.I., McClane, B.A., Songer, J.G., Titball, R.W., 1997, *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. Academic Press, 533 p.
- Snoeck, M., Casacuberta, C., Domingo, R., Pastori, H., Pittaluga, L., 2009, The Emergence of Successful Export Activities in Uruguay: Four Case Studies. *Inter-American Development Bank. Latin American Research Network*.
- Stefanini de Guzmán, A.M., Micalizzi, B., Cortiñas, T.I., Mattar, M.A., 1999, Immunological study of *Clostridium chauvoei* in San Luis. *Anaerobe*, 275 - 278.

- Steinman, A., Chaffer, M., Elad, D., 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. *Clin Vaccine Immunol* 13, 862-868.
- Tamura, Y., Tanaka, S., 1984, Effect of antflagellar serum in the protection of mice against *Clostridium chauvoei*. *Infect Immun* 43, 612-616.
- Tanaka, M., Hirayama, N., Tamura, Y., 1987, Production, characterization, and protective effect of monoclonal antibodies to *Clostridium chauvoei* flagella. *Infect Immun* 55, 1779-1783.
- Troxel, T.R., Burke, G.L., Wallace, W.T., Keaton, L.W., McPeake, S.R., Smith, D., Nicholson, I., 1997, Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. *J Anim Sci* 75, 19-25.
- Useh, N.M., Nok, A.J., Esievo, K.A., 2003, Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. *Vet Q* 25, 155-159.
- Uzal, F.A., 2012, Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28, 71-77, viii.
- Vilei, E.M., Johansson, A., Schlatter, Y., Redhead, K., Frey, J., 2011, Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*. *Vet Res* 42, 2.