

INFORME FINAL DE RESULTADOS

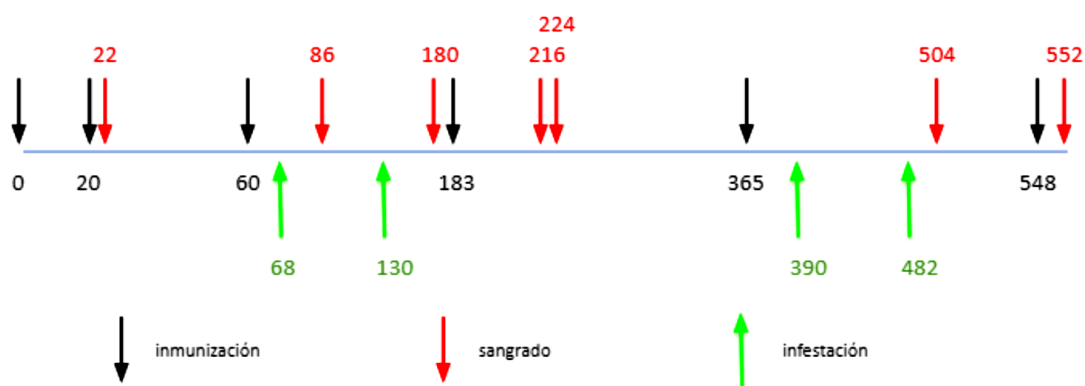
Proyecto: “Determinación del título de anticuerpos generados por vacuna Go Tick (Limor – Colombia) en sueros bovinos (Componente IV Estudio de la eficacia de una vacuna contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante cuatro generaciones consecutivas”.

Técnico: Guzmán Alvarez, Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay.

Objetivo: El proyecto consistió en la determinación del título de anticuerpos generados por vacunación con Go Tick (Limor – Colombia) en bovinos e infestados experimentalmente con larvas de garrapata vs. animales únicamente infestados, a través del diseño de un inmunoensayo en formato ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Estrategia de trabajo. Se dividieron las muestras en dos subgrupos (ensayo piloto y ensayo total), un grupo de muestras pequeño y representativo fue analizado por un equipo técnico, con equipamiento e instalaciones distintas al del segundo análisis realizado por otro equipo de técnicos. El segundo análisis se realizó con todas las muestras. Esto se hizo para garantizar la imparcialidad de los resultados y garantizar la veracidad de los mismos y de cross check de la metodología de trabajo.

Protocolo de inmunización (experimento previo realizado por otro equipo técnico Dr. Ulises Cuore 2016): los animales se dividieron en dos grupos, el grupo control formado por 3 animales infestados experimentalmente con garrapata (animales 3373, 3329 y 337) y el grupo vacunado e infestado formado por 7 animales (animales 3392, 3364, 3399, 324, 3271, 338 y 3370). Los animales fueron vacunados y/o infestados en varias ocasiones y se obtuvieron muestras de sangre a distintos tiempos para seguir el título de anticuerpos (ver Esquema 1). Cabe aclarar que el animal 338 del grupo tratado murió luego del día 86 y que faltaron algunos sueros de los días 180, 504 y 552 en ambos grupos.



Esquema 1: Diseño experimental de inmunización, infestación y sangrado. Esquema representativo del tiempo de duración del experimento (línea azul), en donde se indica con flechas negras los días de inmunización, con flechas rojas los días de sangrado y con flechas verdes los días de infestación.

Materiales y Métodos

Para el ensayo piloto: **Materiales:** Se contó con 100 µl de los sueros de los 10 animales correspondientes a los días 22, 86, 180, 216, 224, 504 y 552 del experimento y con el antígeno vacunal liofilizado para el diseño del inmunoensayo.

Metodología: Se diseñó y optimizó un ELISA indirecto, utilizando una solución del antígeno vacunal para sensibilizar las placas, diluciones seriadas de las muestras y un anticuerpo secundario anti-IgG bovinas conjugado a peroxidasa para el revelado (Sigma #A5295). Cada suero se corrió por triplicado en diluciones seriadas, obteniendo curvas que se ajustaron a una sigmoide y se determinó el IC50 en unidades arbitrarias (u.a.) +/- la desviación estándar (SD), el cual corresponde al título de anticuerpos en cada suero.

Para el ensayo total:

1. Detección de anticuerpos específicos

Se sensibilizaron placas de ELISA con 1 ug/pocillo del lisado parasitario utilizado para la vacunación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se bloqueó con gelatina al 1% en PBS durante 1 h a 37°C. Luego, se incubaron los sueros a diferentes diluciones en gelatina al 0.5% en PBS durante 1 h a 37°C, seguido de un anticuerpo secundario anti-bovino IgG conjugado a la peroxidasa de rábano. Posteriormente se reveló con la adición del sustrato colorimétrico OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride). El desarrollo de color se midió a 492 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

2. Determinación de la avidéz de anticuerpos específicos

Se realizó el ELISA de detección de anticuerpos específicos en presencia de UREA 6 M, la cual fue incubada por 30 min a 37°C previo a la adición del anticuerpo secundario.

3. Detección de anticuerpos IgG totales

La determinación de las IgG totales se realizó utilizando un kit comercial (ab205078). Este es un ensayo sándwich que utiliza dos anticuerpos que reconocen IgG de bovinos. Se utilizó un estándar para calcular los títulos de IgG.

Resultados ensayo piloto.

Se pudieron obtener los títulos de anticuerpo para todos los sueros de los días 22, 86, 180, 216, 504 y 552. Se desestimó la determinación del título de anticuerpos del día 224 (sueros del N°37 al 45) por ser muy próximo al día 216 y carecer de sentido biológico. Los títulos de anticuerpos de cada suero se informan como IC50 +/- SD (ver Tabla 1).

Tabla 1. Título de anticuerpo determinado como IC50 +/- SD. Se informan los títulos de anticuerpos de cada muestra, indicando el animal al que pertenecen y el día de extracción. La determinación se hizo por triplicado y se ajustó a un modelo no lineal. El IC50 +/- SD corresponde al título de anticuerpo de la muestra y su desvío estándar asociado. En rojo se resalta el animal que murió luego del D86 y en celeste se resaltan los animales del grupo control.

Día	Nº animal	Muestra	Título	
			IC50 (u.a.)	SD
D22	3392	1	133,75	43,77
	3364	2	165,95	27,59
	3399	3	63,58	30,66
	324	4	83,59	64,44
	3271	5	142,03	8,61
	338	6	33,28	8,22
	3373	7	94,95	18,11
	3329	8	92,61	10,86
	337	9	40,62	8,18
	3370	10	75,34	37,11
D86	337	11	50,50	7,62
	3329	12	tubo vacío	
	3373	13	82,81	76,80
	338	14	67,08	40,67
	3271	15	869,08	123,97
	324	16	114,44	30,41
	3399	17	150,25	58,17
	3364	18	454,33	133,37
	3370	26	500,81	42,67
	3392	27	326,10	9,84
D186	3370	19	86,52	23,43
	3392	20	30,27	3,52
	3364	21	78,89	36,79
	324	22	147,32	21,90
	3271	23	652,52	69,68

Día	Nº animal	Muestra	Título	
			IC50 (u.a.)	SD
D186	3373	24	128,52	83,16
	337	25	99,37	12,58
D216	337	28	120,55	17,44
	3329	29	396,91	25,41
	3373	30	43,90	14,66
	324	31	43,86	21,99
	3271	32	562,00	33,93
	3399	33	634,64	10,75
	3364	34	112,34	42,63
	3392	35	89,11	48,19
	3370	36	243,24	4,96
	D504	337	46	148,00
3271		47	1295,67	41,40
324		48	711,82	177,79
3399		49	432,14	16,01
3364		50	106,82	30,67
3392		51	141,75	28,69
3370		52	261,95	67,94
3370		53	180,59	31,09
D552	3392	54	228,76	39,86
	3364	55	158,98	50,32
	3399	56	528,45	17,25
	324	57	868,73	21,26
	3271	58	951,675	21,16
	337	59	39,80	12,80

A modo representativo se adjuntan gráficos con la evolución del título de anticuerpo en el correr del experimento para los animales control (Figura 1a), para los animales tratados (Figura 1b) y para todos los animales superpuestos (Figura 1c).

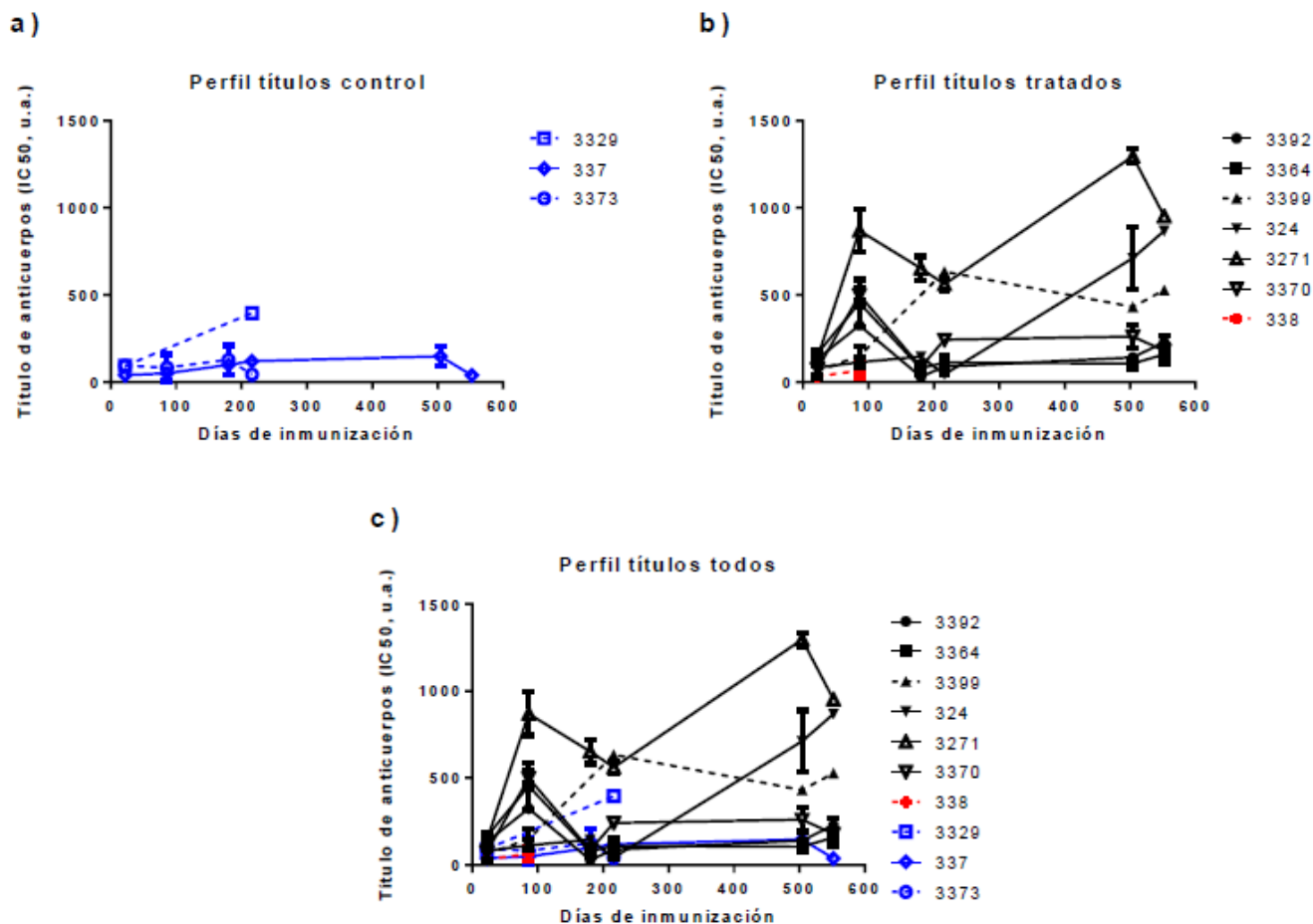


Figura 1. Evolución del título de anticuerpos en el correr de la inmunización. Se grafica el título de anticuerpos como IC50 en función de los días de inmunización. En a) se grafican los animales control, en b) los tratados y en c) todos los animales. Las líneas punteadas indican que el perfil del título no está completo por falta de muestra en alguno de los tiempos evaluados.

Se pudo completar la evolución del título de anticuerpos a lo largo del protocolo de inmunización de un único animal del grupo control, mientras que para el grupo tratado se completó el perfil para 6 de los 7 animales (Ver Figura 1a y 1b). En el grupo control se observa el título máximo de anticuerpo entre los D186 y D216 en respuesta a las dos infestaciones previas de los días D68 y D130 en el animal 3329, del cual no se tienen más datos por carecer de muestras correspondientes a los días posteriores. Por su parte el único animal del cual se tiene el perfil completo es el 337, pero este individuo mostró una pobre respuesta a lo largo del protocolo de infestaciones con títulos siempre menores a 150 u.a. (ver Figura 1a).

En el grupo tratado, los animales mostraron un comportamiento totalmente diferente. En general los individuos presentaron títulos de anticuerpos más altos en comparación con el grupo control a lo largo de toda la inmunización. Se destaca un aumento del título de anticuerpos en respuesta al refuerzo del D68 medido el D86 en 4 individuos (3392, 3364, 3271 y 3370, ver Figura 1b), alcanzando niveles máximos de 869 u.a. Por otra parte, la respuesta al refuerzo de los D183 y D548 fue evidente en menos animales (3370 y 3364 en el D216; 324, 3399 y 3392 en el D552) y alcanzó niveles máximos de 951 u.a. en el D552 (ver Figura 1b). Cabe destacar que las muestras del D552 no son representativas de la completa respuesta al refuerzo del D548, ya que 4 días es un período corto para poder visualizar el aumento del título de anticuerpos circulantes en suero. Finalmente, el D504 se observa que dos de los animales tratados (324 y 3271) respondieron a la infestación del D482, y uno de ellos alcanzó el mayor título registrado en el experimento cercano a 1290 u.a (ver Figura 1b).

Resultados del ensayo total.

Identificación de las muestras

Días experimento	N de animales por grupo
D0	7 animales CTL* (otro experimento)
D22	7 vacunados / 3 CTL
D86	7 vacunados/ 3 CTL
D180	5 vacunados/ 2 CTL
D216	6 vacunados/ 2 CTL
D224	6 vacunados/ 2 CTL
D504	6 vacunados/ 1 CTL
D552	6 vacunados/ 1 CLT

*animales no vacunados

IgG específicos de Garrapata

Specific IgG antibodies against Tick Vaccine

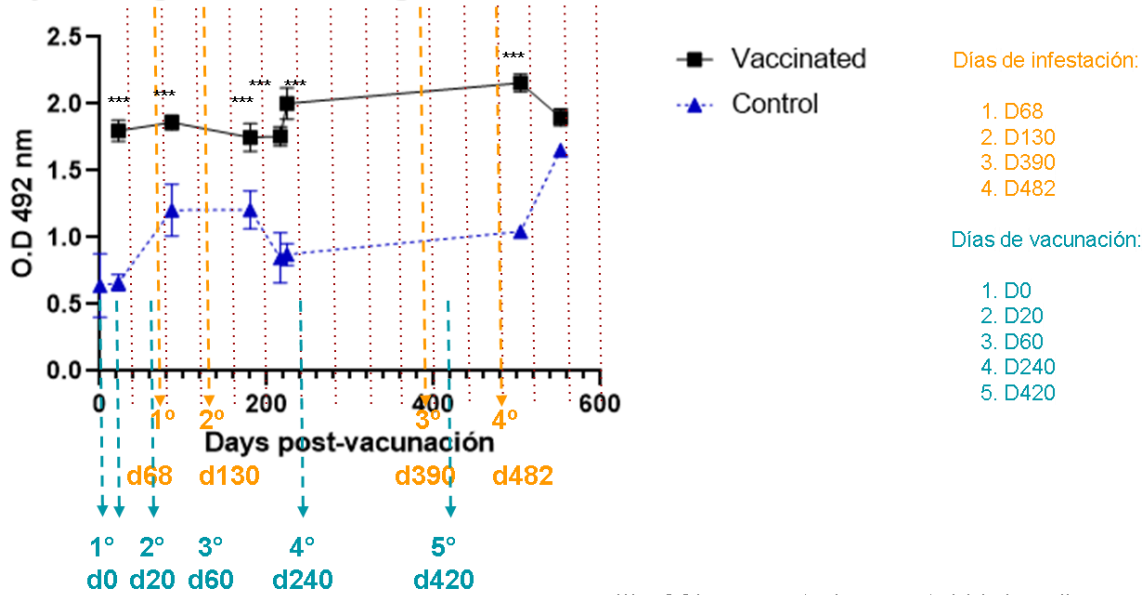


Figura 2. Evolución del título de anticuerpos en el correr de la inmunización. Se indican los títulos con sus respectivos errores, además los días de vacunación y de infestación.

Avidéz IgG totales Garrapata

Avidity of Specific IgG antibodies against Tick Vaccine

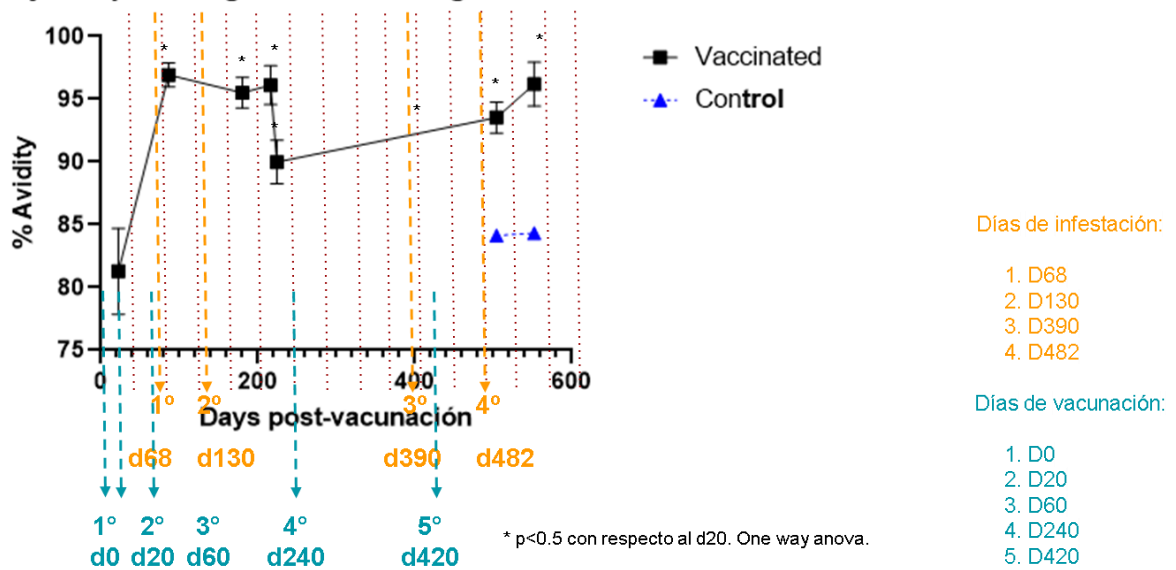
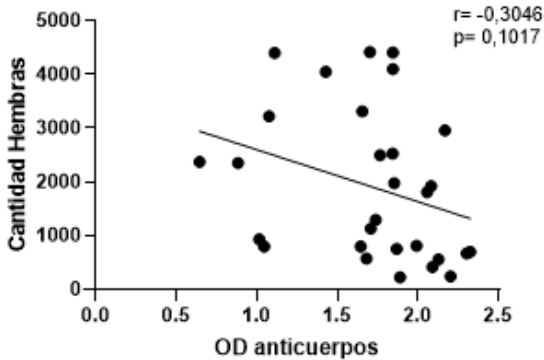


Figura 3. Porcentaje de avidéz, fuerza relativa con la cual se unen los anticuerpos al antígeno, a mayor porcentaje mayor fuerza. Se consideraron solo los de DO mayor a 0.6 con urea por el limite de detección.

Numero de hembras vs OD Anticuerpos vacuna



Peso de hembras vs OD Anticuerpos vacuna

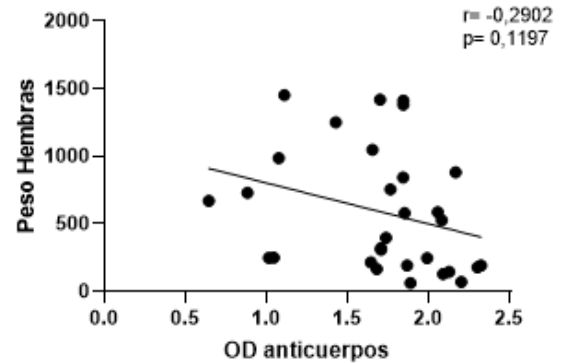


Figura 4. Se muestra la correlación entre el título de anticuerpos específicos con el número y peso de teleoginas por animal. Días de vacunación: D0, D20, D60, D240, D420 Días de infestación: D68, D130, D390, D482.

Peso huevo vs OD Anticuerpos vacuna

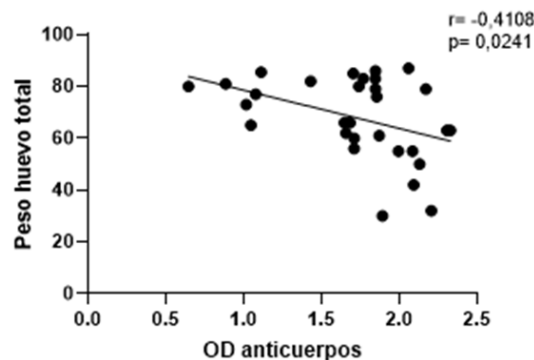


Figura 5 Se muestra la correlación entre el título de anticuerpos específicos y peso de huevos. Días de vacunación: D0, D20, D60, D240, D420 Días de infestación: D68, D130, D390, D482.

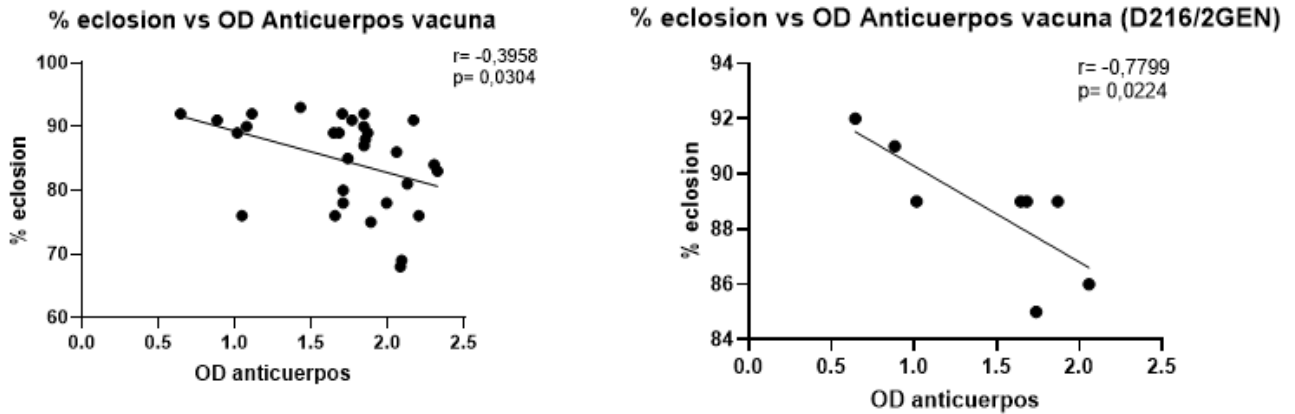
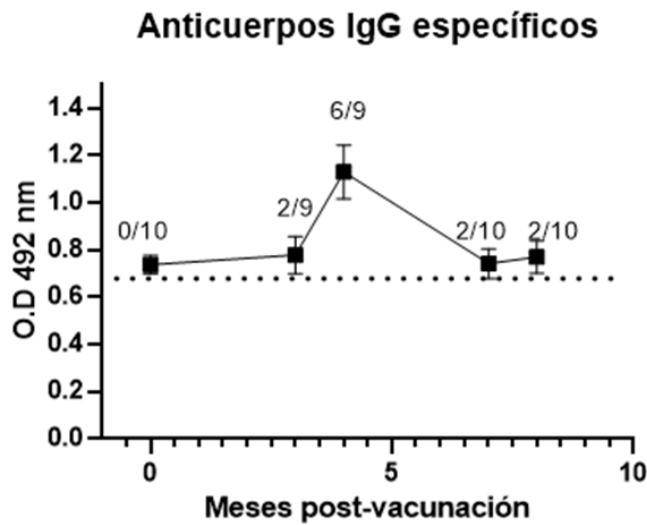


Figura 6. Se muestra la correlación entre el título de anticuerpos específicos y % eclosion de los huevos, esto se hace mas notorio al día 216, en la segunda generación (grafico derecho).



(en numero: anticuerpos de alta avidez)

* $p < 0.5$ con respecto a otros días. One way anova.

Figura 7. Se muestra el título de anticuerpos específicos en animales vacunados a campo, considerar que no hay infestación artificial y que los animales están expuesto a tratamiento acaricida durante los experimentos. Los números indican cuantos de los sueros son de alta avidez.

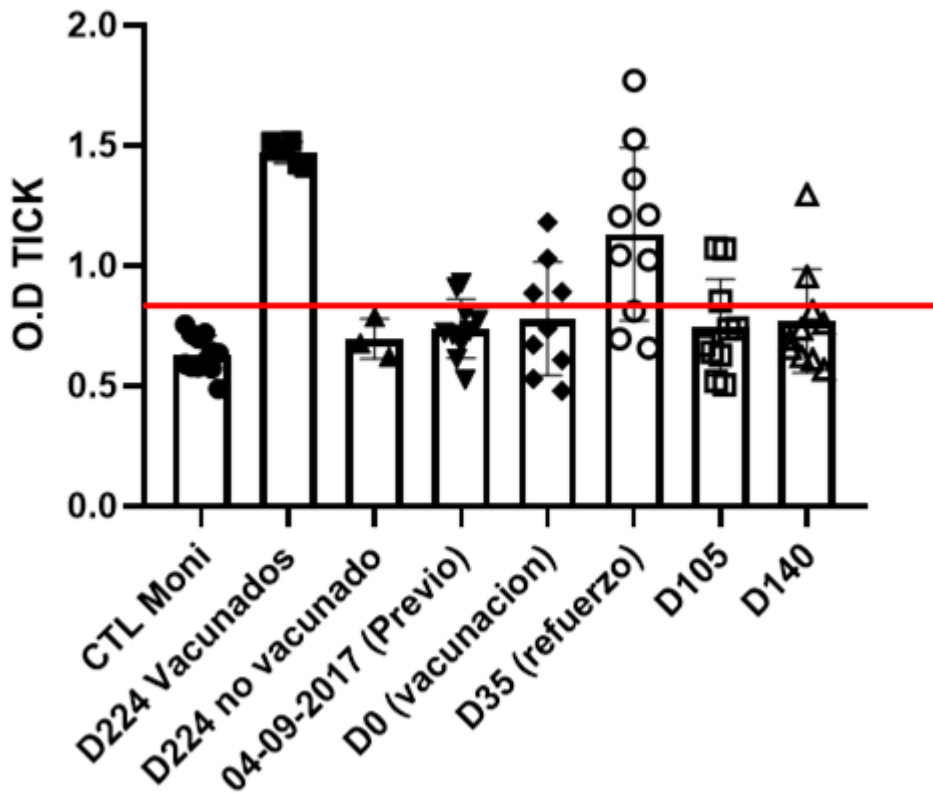


Figura 8. Se muestran los títulos de anticuerpos para animales no vacunados de experimento en boxes (CTL moni, D224) y vacunados (D224), y los del experimento a campo no (previo, D0) y luego de la vacunación (D35, 105 y 140). La línea roja indica no diferencia entre los títulos de vacunado y no vacunado.

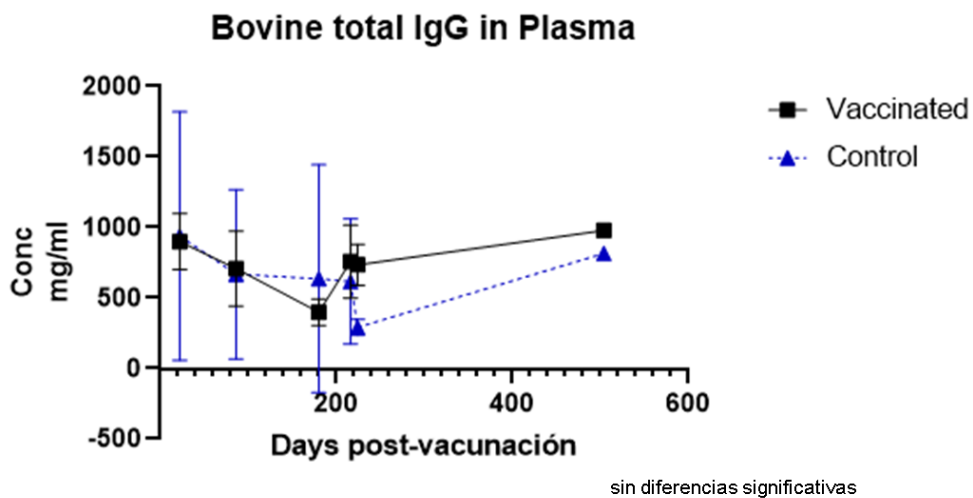


Figura 9. Indica la concentración de anticuerpos IgG en plasma para el experimento en boxes.

Conclusión: Todos los animales vacunados demostraron producción de anticuerpos Figura 1 y 2, esta se mantiene en un rango constante que no fluctúa entre los tiempos de los refuerzos, ni con la infestación. El resultado se repitió independientemente por los dos equipos de trabajo garantizando así la metodología de trabajo. Estos anticuerpos generados por la vacunación además se unen con fuerza a los antígenos de la vacuna Figura 3. Esto es importante ya que los anticuerpos generados naturalmente por los animales no vacunados no se unen con fuerza al antígeno, indicando que la generación de anticuerpos por la infestación, es menor y de menor fuerza. Además, hay una correlación entre los tiempos de infestación y la avidéz de los anticuerpos, y no así con los refuerzos, es decir que una vez vacunados los animales responde con anticuerpo específicos que se unen con fuerza al antígeno luego de cada infección.

Los anticuerpos vacunales se correlacionan de forma negativa con el peso y porcentaje de eclosión de los huevos de la garrapata. Al día 216 en la segunda generación de la Garrapata, se nota más el impacto en la eclosión de huevos (Figuras 4, 5 y 6).

Con respecto al experimento de campo, también hay un aumento significativo de los anticuerpos con respecto los animales no vacunados, pero este se hace más notorio solo en la primera dosis y no en los refuerzos. Considerar aquí que las infecciones no son tan fuertes como en el experimento en boxes, dado que la carga parasitaria circulante en el campo es más baja y están bajo tratamiento químico. Los rangos de anticuerpos generados en el experimento a campo y el de boxes son similares, para la primera dosis de la vacuna (Figura 8).

Finalmente, la concentración de IgG en el suero es similar en los animales no vacunados y los vacunados, por lo que se puede pensar en que los IgG circulantes en los animales vacunados son un gran porcentaje del total. Podríamos decir que la producción de anticuerpos generados por la vacuna es de alto rendimiento.