

MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN

Poggio Thelma Verónica, PhD

Centro de Virología Animal – CEVAN-ICT Milstein (CONICET)



¿Es posible desarrollar vacunas contra parásitos helmintos?

¿Es posible lograr un alto nivel de protección contra la infección, utilizando antígenos recombinantes?

"SÍ"

Protección segura entre 90 y 100% con antígenos recombinantes contra :

Taenia ovis en la ovinos, *Taenia saginata* en bovinos
Echinococcus granulosus en ovinos, caprinos y bovinos y *Taenia solium* en porcinos

¿Por que las vacunas recombinantes desarrolladas “exitosamente “ y que confieren protección, involucran solo a las tenias (cestodes)?

¿Existen aspectos inmunológicos relacionados entre metacestodes de tenias y sus hospederos?



“SI”

1. La infección lleva a un estado de inmunidad a la reinfección.
2. Hospederos **naive** pueden ser protegidos contra la infección inicial por inmunización con extractos de parásitos inactivados.
3. Los hospederos **naive** pueden ser protegidos contra la infección inicial por transferencia pasiva de suero de un hospederos infectado o un hospederos anteriormente inmunizados activamente.
4. Existe un alto grado de reactividad cruzada entre antígenos de diferentes especies de tenias y se reflejó tanto en la inmunización activa como en la transferencia pasiva de inmunidad utilizando antígenos o suero inmune de especie heterologas.

Red Institucional de I&D de Providean Hidatil EG95®



THE UNIVERSITY OF
MELBOURNE



PROCEDIMIENTOS INCORPORADOS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCION DE LA VACUNA EN ARGENTINA

El objetivo de nuestro desarrollo en Argentina fue asegurar la efectividad de Providean Hidatil EG95 y su bioequivalencia con la formulación Australiana

1. Expresión de la Proteína y Purificación

- a) Expresión Intracitoplasmática de EG95
- b) Semi-purificación

2. Selección del adyuvante

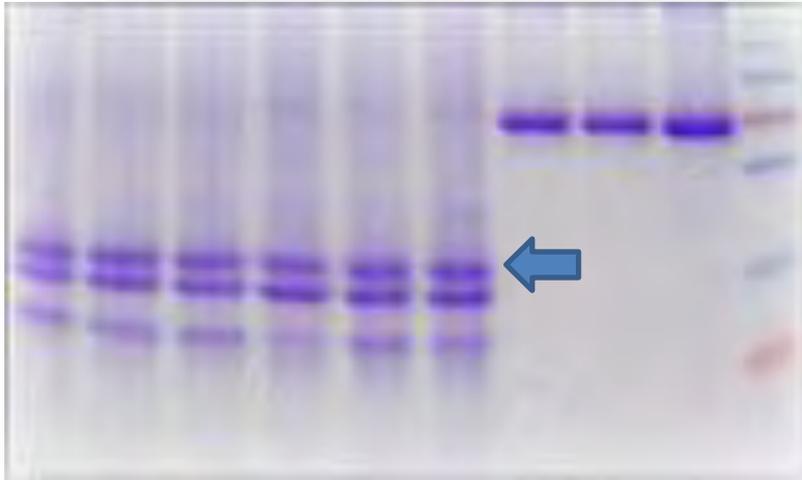
- a) EG95 + Montanide ISA 70 Seppic más Saponina
- b) EG95 + Hidróxido de Aluminio (Hydrogel) más Saponina

3. Respuesta inmune inducida en ovinos por vacunación con EG95 combinada con diferentes adyuvantes



Expresión de EG95

Cuantificación de Antígeno

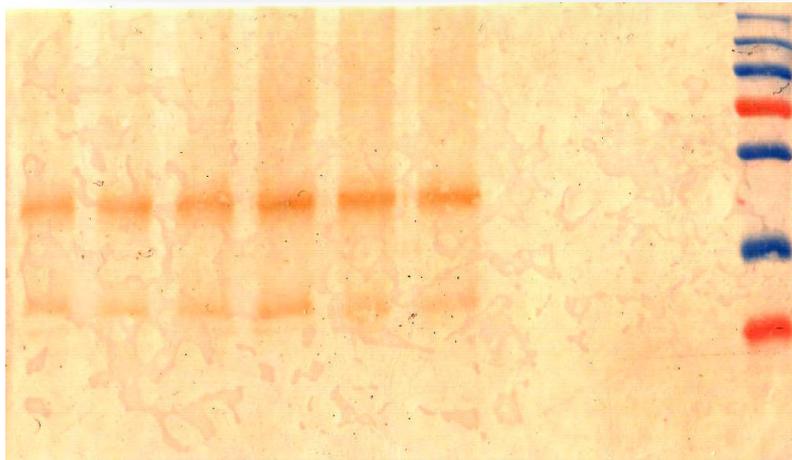


Product: Providean Hidatil Eg95 (ug/mL in aqueous phase)

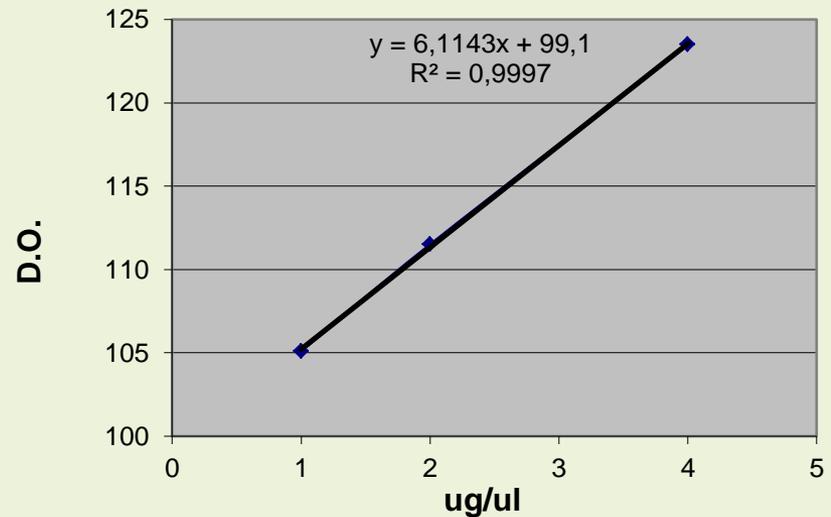
Batch Number: 001/10

Image J

	Vol (μl)	Densitom.	(μg) in 20ul	μg/ 1mL
1	20	108,625	1,052	52,6
2	20	106,781	1,035	51,75
3	20	105,484	1,024	51,2
4	20	108,387	1,05	52,5
5	20	105,936	1,028	51,4
6	20	109,047	1,058	52,9
7 BSA 1mg/mL	1	105,1	Average:	52,05
8 BSA 1mg/mL	2	111,5		
9 BSA 1mg/mL	4	123,5		



EG95 Antigen quantification



Ensayo a campo



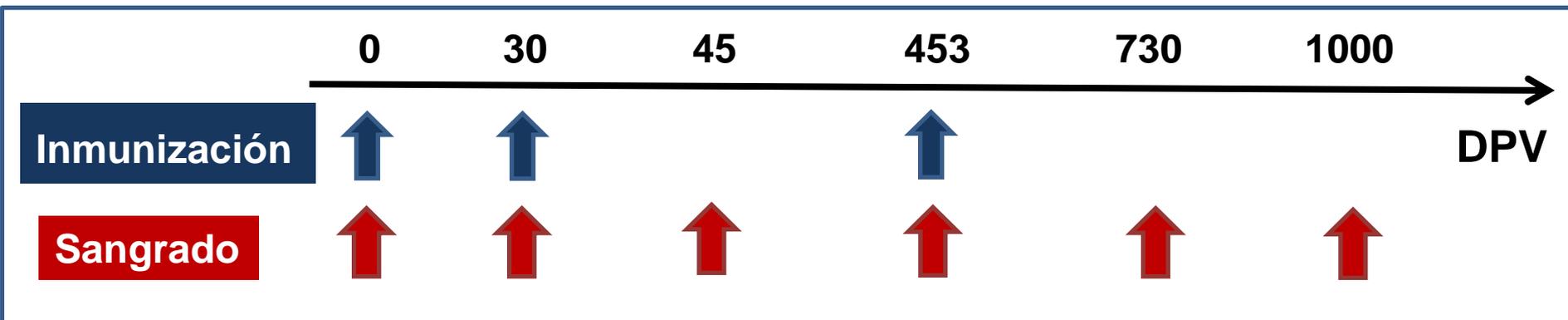
Establecimiento: “La Isla” (42° 25’ S–64° 31’ O)

Familia Iriarte. Depto Biedma, Prov. Chubut

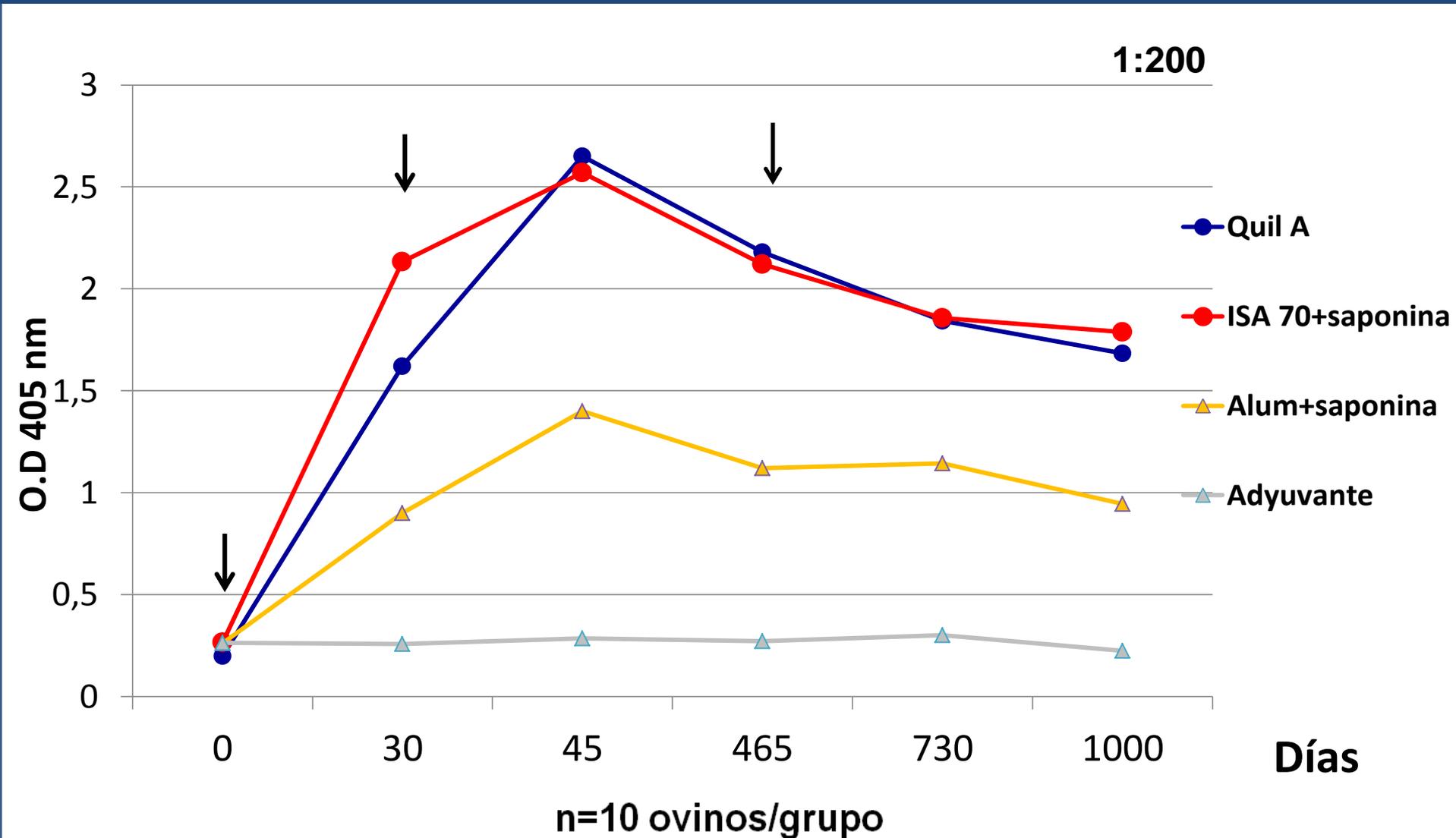
Fecha iniciación: 09 de Mayo de 2009

Ultimo sangrado: 14 febrero 2012

- ◆ Cuatro grupos de 10 ovinos, de 6 meses fueron inmunizados (subcutaneamente) con 2 dosis (0-30 DPV), y refuerzo a los 453 dpv con diferentes formulaciones conteniendo la proteína EG95 :
- ◆ Dos grupos fueron inmunizados con 50 µg EG95 ya sea combinada con hidróxido de aluminio + 0.125 mg saponina o Montanide ISA70 + 0.125 mg saponina.
- ◆ Otro grupo recibió vacuna Australiana (50 µg EG95+1mg QuilA)
- ◆ Un grupo sirvió como control y recibió solo adjuvante oleoso.

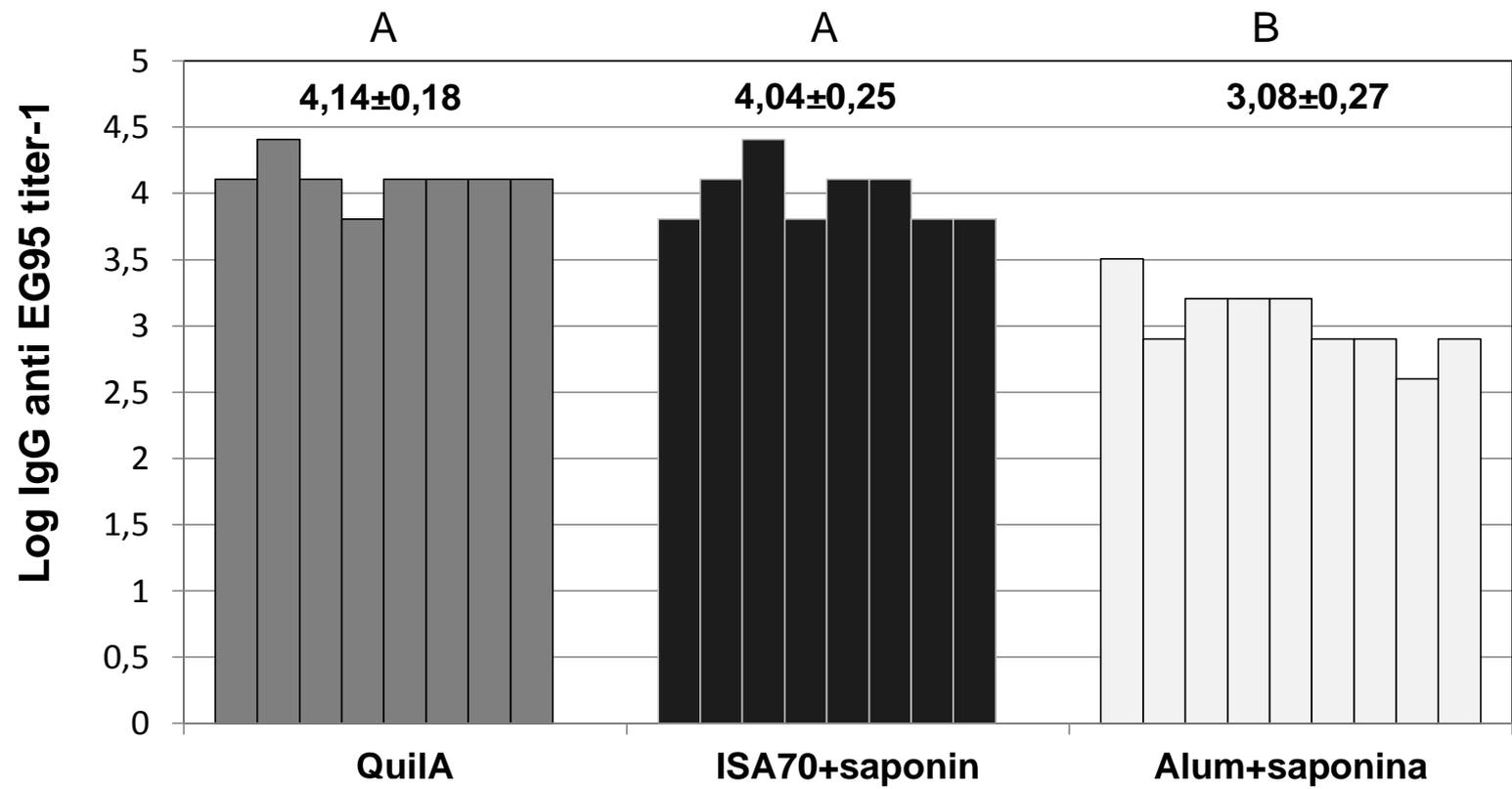


Niveles de IgG anti-Eg95 inducidos en ovinos vacunados con 3 dosis de diferentes formulaciones



Inmunización ovinos con 2 dosis de diferentes formulaciones

Titulos séricos obtenidos a 45dpv

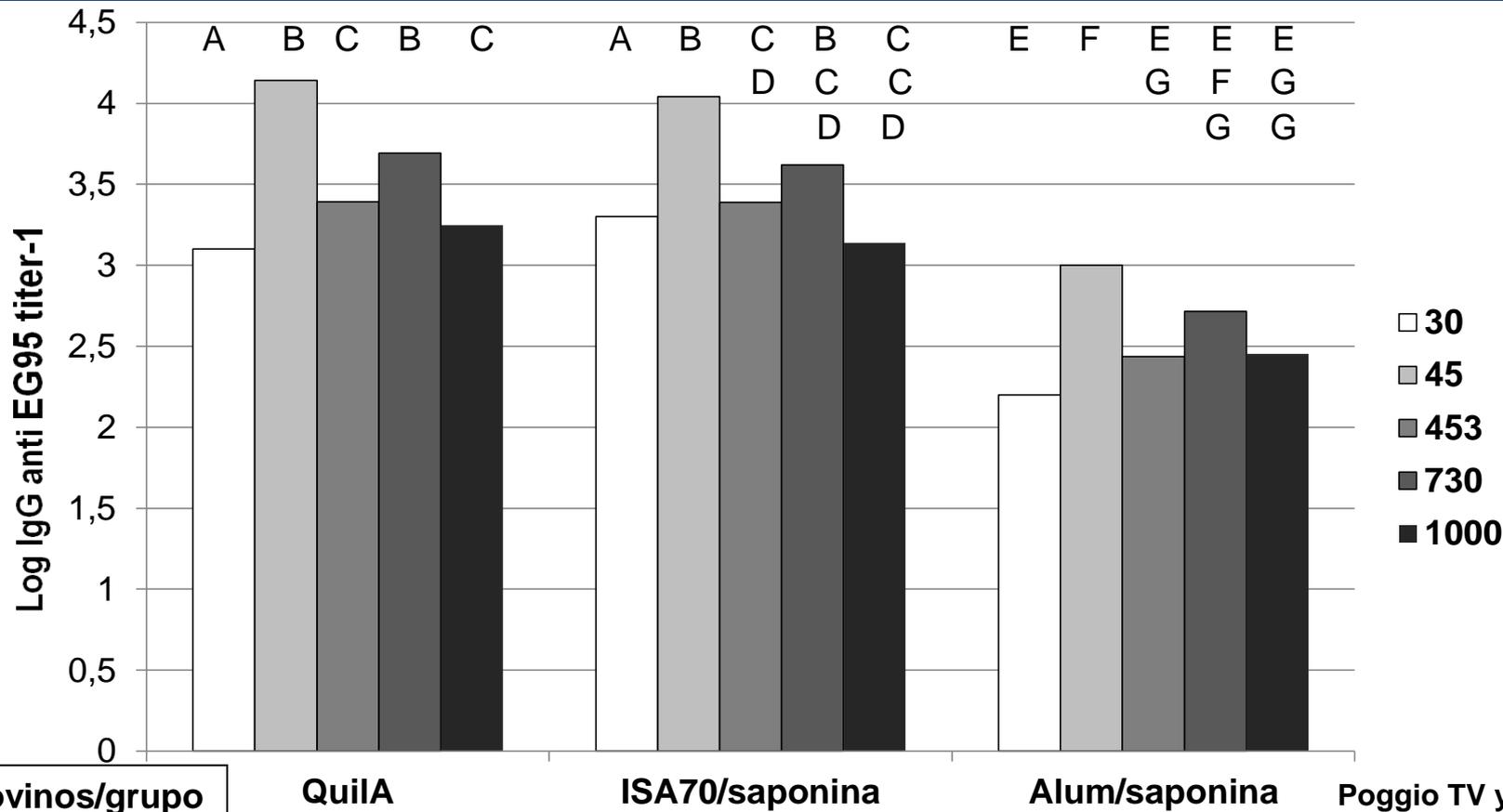


n=10 ovinos/grupo

Poggio TV y col 2012

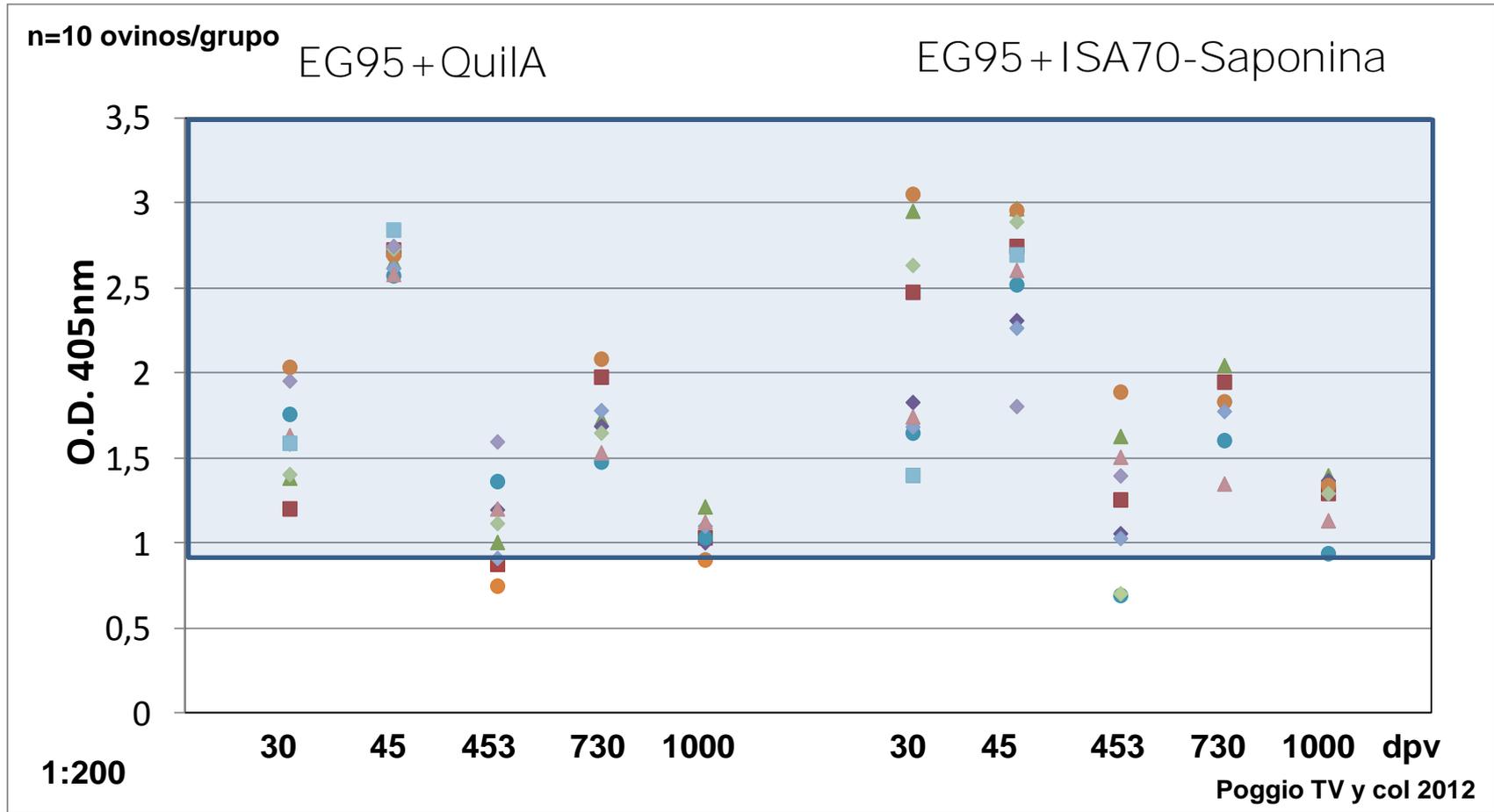
El grupo vacunado con la proteína recombinante combinada con ISA70/saponina mostró títulos de anticuerpos mayores a 4 Log, similares a los observados en el grupo vacunado con la proteína EG95 combinada con QuilA.

Duración de la inmunidad (días)



Se determinó la longevidad de la inmunidad luego de 2 inmunizaciones, antes y después del refuerzo anual y a los 1000 dpv. Luego de 2 dosis, en los grupos vacunados con EG95 ya sea con ISA70/saponina o QuilA mostraron títulos séricos que persistieron por más de 12 meses. Luego del refuerzo anual, a 730 y 1000 dpv se alcanzaron títulos similares a los obtenidos a 453dpv. Mientras que los títulos obtenidos con la formulación acuosa luego de luego de 2 dosis más refuerzo fueron significativamente menores a los mostrados por la formulaciones oleosa y australiana.

Cierto nivel de anticuerpos es requerido para mantener la protección...



Con el paso del tiempo, el título de anticuerpos específicos van disminuyendo y durante ésta etapa parte del grupo puede mostrar cierta susceptibilidad, o los niveles de anticuerpos pueden no ser suficiente para proteger al grupo completamente, a menos que se realice una tercera vacunación anual.

Monitoreo inmunidad inducida por Providean Hidatil EG95®

Con el objetivo de contribuir al sistema de vigilancia epidemiológica y demostrar potencia de la vacuna Providean Hidatil EG95.

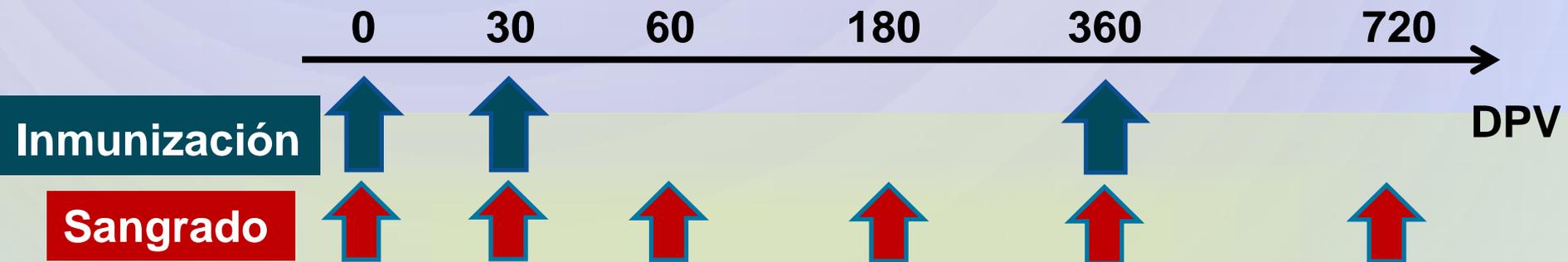
a) Diseño de PROTOCOLO DE ENSAYO

Grupo 1: Vacuna comercial Providean Hidatil EG95®

Grupo 2: Placebo formulado sin antígeno proteico EG95
(n= 10 animales menores de 6 meses)

Grupo 3:

**POTENCIA!!!
Incluir
Vacuna australiana**



Con fines de organización, las actividades técnicas se han agrupado de la siguiente manera:

-Módulo 1:

a) Diseño de protocolos de ensayo para seleccionar, adaptar y desarrollar distintas estrategias de detección y cuantificación de anticuerpos anti-EG95.

b) Preparación, purificación, identificación y caracterización de antígenos recombinantes

c) Desarrollo de anticuerpos mono y policlonales, sueros controles positivo, negativo y de referencia de interés epidemiológico, preparación y provisión de reactivos.

d) Formación de recursos humanos relacionados a la temática del proyecto tanto a nivel técnico como científico ya que el personal a entrenar rotará por los diferentes laboratorios a fin de adquirir formación interdisciplinaria.

e) Transferencia de la tecnología a los laboratorios de referencia, provinciales y regionales habilitados para el control de la hidatidosis en la Republica Argentina.

-Módulo 2 :

-Priorizar el cumplimiento de los requisitos técnicos y la estandarización y validación de las técnicas:

a) Estandarización y Validación de la técnica

b) Incorporación al Banco de muestras sueros provenientes de especies animales susceptibles a la enfermedad (cerdo, camelidos, llama, bovino, ciervo, caballo, etc).

c) Establecer programa de control de calidad de medios, reactivos, etc. Establecer controles internos de las pruebas para el cumplimiento de los requisitos para la Certificación / GMP/ MERCOSUR.

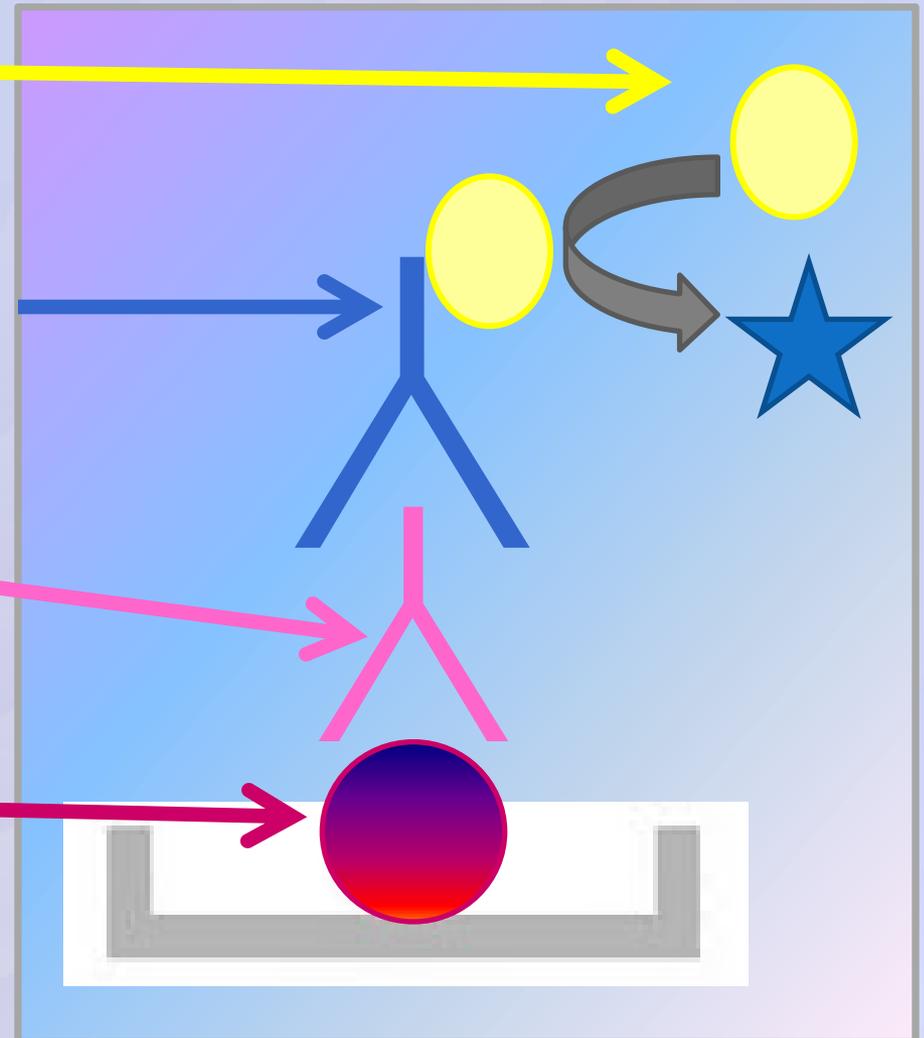
ELISA FASE SÓLIDA

◆ Sustrato ABTS-H₂O₂

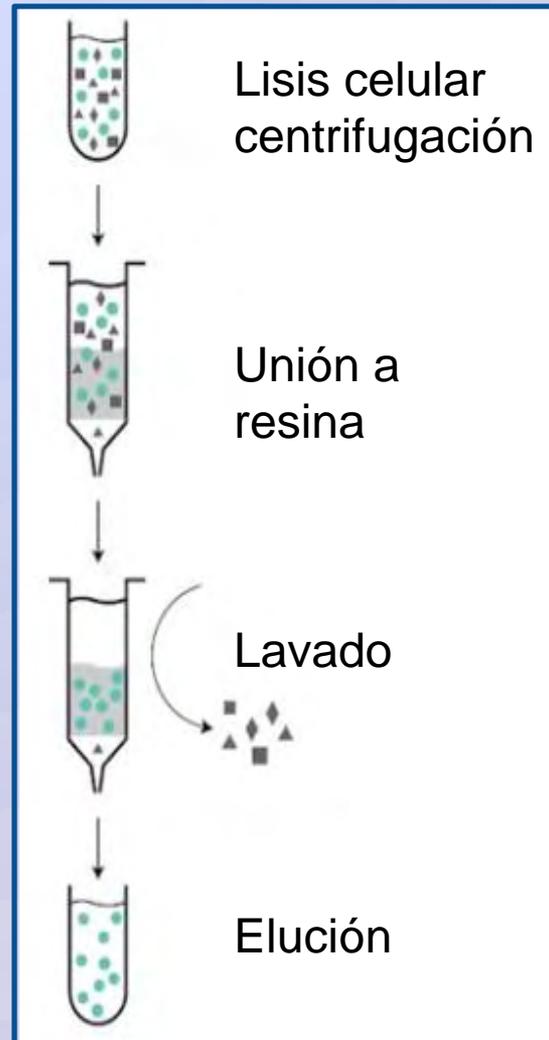
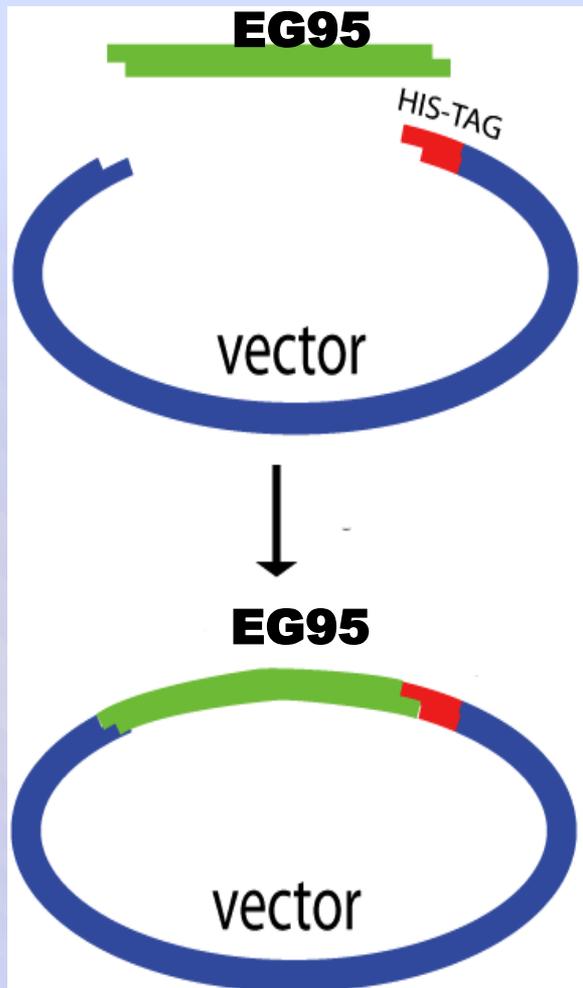
◆ Conjugado anti-especie-HRP

◆ Suero a testear Ac anti-EG95?

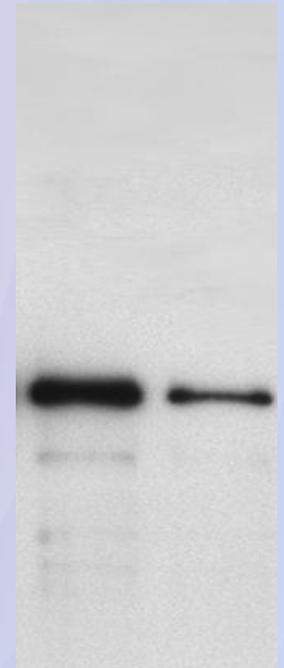
◆ Antígeno EG95 recombinante



Preparación, purificación, caracterización de Ag /ELISA



SDS-PAGE



WB

Diseño de Placa/Potencia/Validación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
O1	(-)	(+)	STD	S1	S2	S3	(-)	(+)	STD	S1	S2	S3	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	200
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	400
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	800
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1600
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3200
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	6400
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	12800
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	25600

**Vacuna
Australiana**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
O2	(-)	(+)	STD	S1	S2	S3	(-)	(+)	STD	S1	S2	S3	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	200
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	400
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	800
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1600
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3200
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	6400
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	12800
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	25600

**Providean
Hidatil EG95**

CRITERIOS DE ACEPTACION

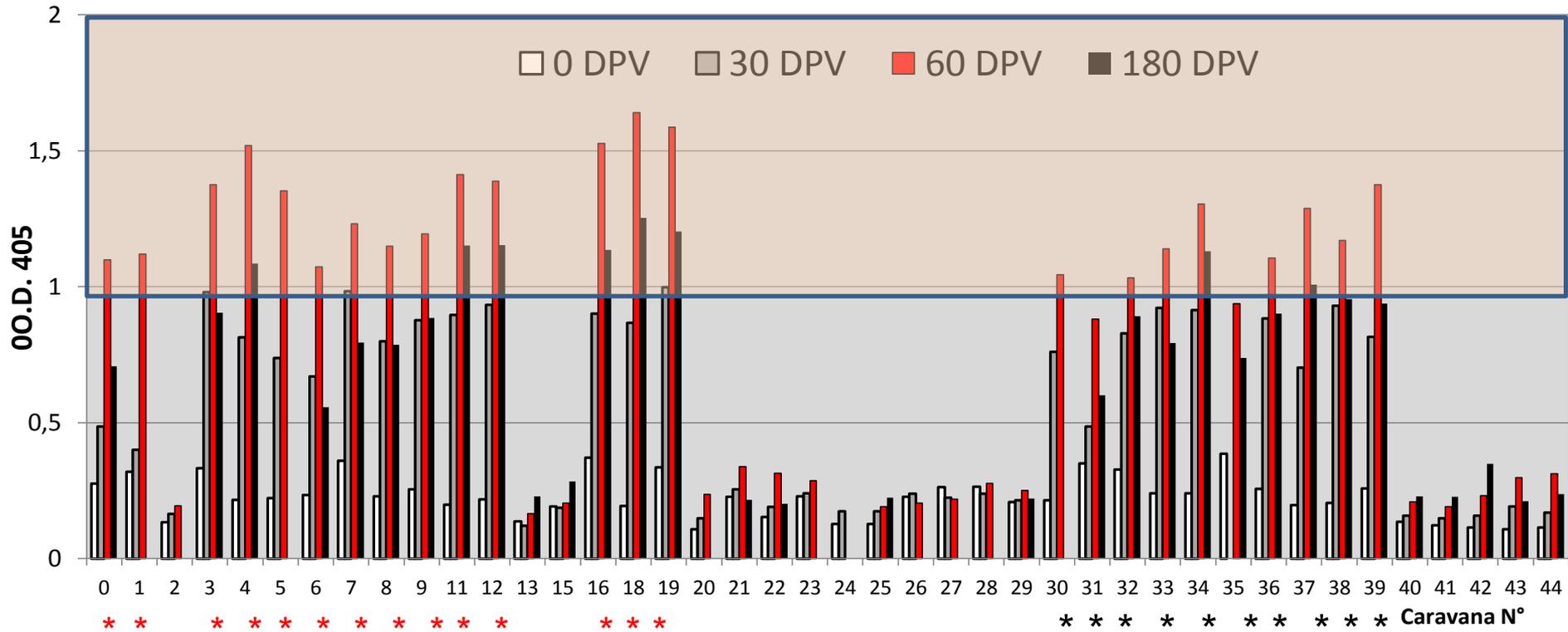
A día 0

- ◆ Si cualquier suero muestra una O.D. $\geq 0,4$ el **ELISA DEBE SER REPETIDO**.

A día 60

- ◆ Si el Coeficiente de variación (CV) de las muestras por duplicado es $>$ al 15% el ELISA debe ser repetido.
- ◆ Si 8 de 10 sueros de ovinos testeados para Providean Hidatil EG95 tienen una densidad óptica a dilución 1:200 \geq al Suero Estándar a esa dilución la **VACUNA CUMPLE**.
- ◆ Si 8 de 10 sueros de ovinos testeados para Vacuna Australiana tienen una densidad óptica a dilución 1:200 \geq al Suero Estándar a esa dilución la **PRUEBA de POTENCIA es VALIDA**.

MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN



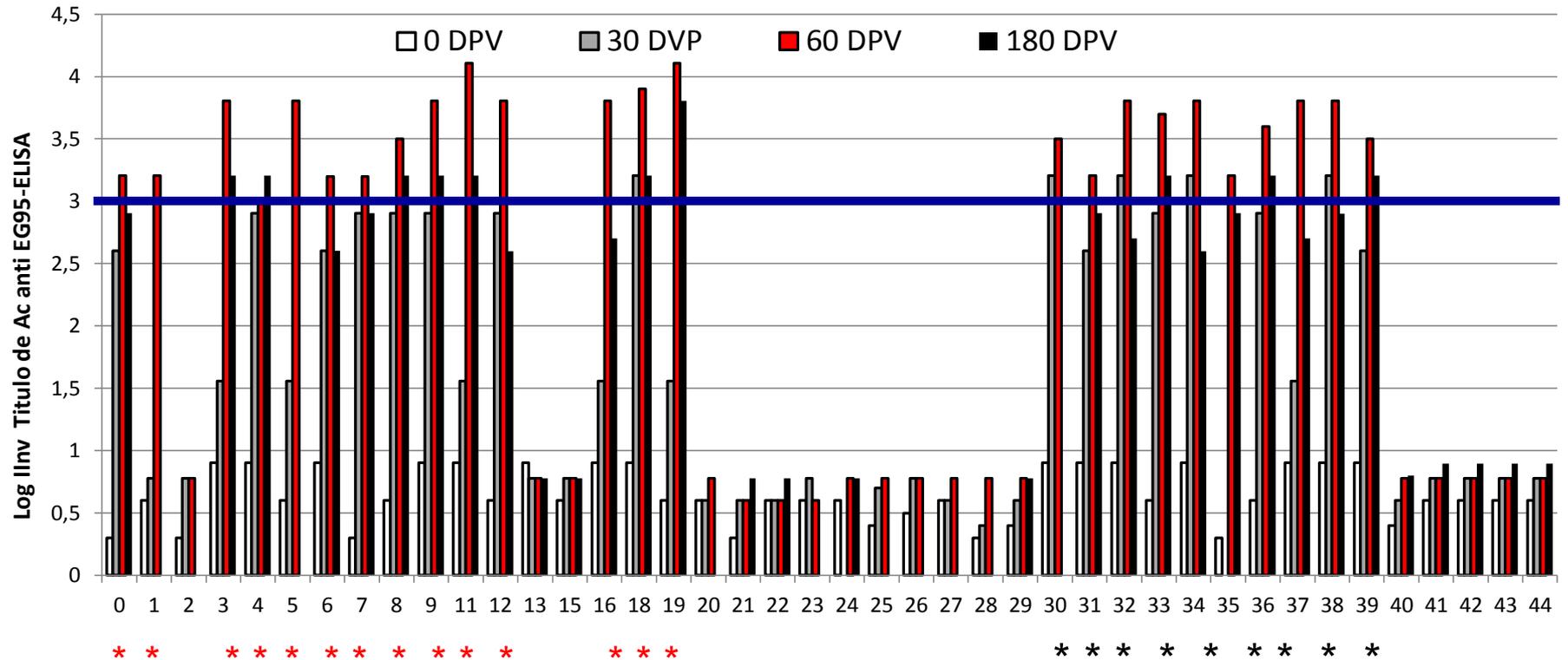
Proyecto VACUNA EG 95 - Departamento Investigacion en Salud Sarmiento - Chubut
Lugar de aplicación de la vacuna EG95: Estacion Gomez/ Coronel Brandsen Fecha: 13 /11/2011

Establecimiento : Don Gervacio
Establecimiento : Los Pepinos

Propietario : German Barrera
Propietario : Jose Celio Vanore



MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN

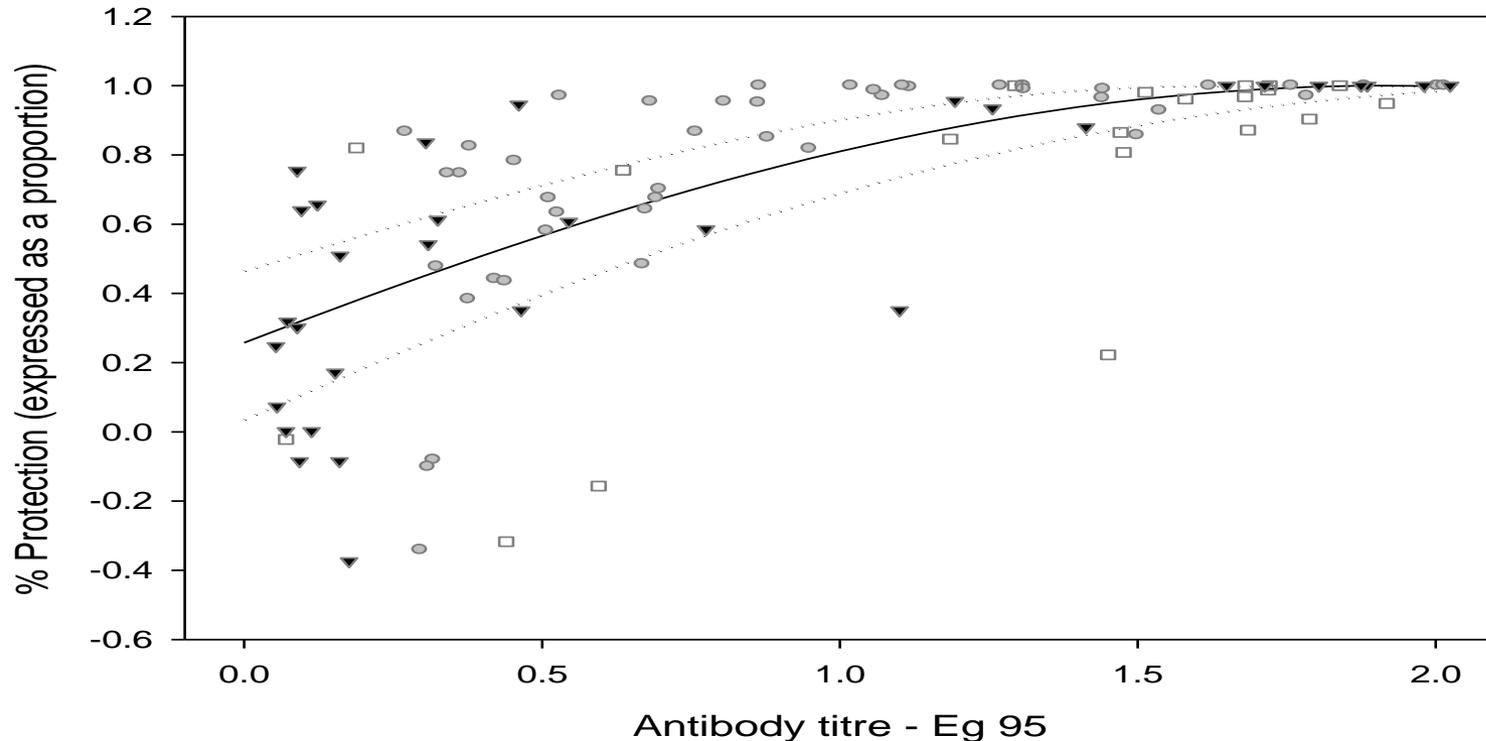


Proyecto VACUNA EG 95 - Departamento Investigacion en Salud Sarmiento - Chubut
Lugar de aplicación de la vacuna EG95: Estacion Gomez/ Coronel Brandsen Fecha: 13 /11/2011
Establecimiento : Don Gervacio Propietario : German Barrera
Establecimiento : Los Pepinos Propietario : Jose Celio Vanore



PROTECCION VS. TITULO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

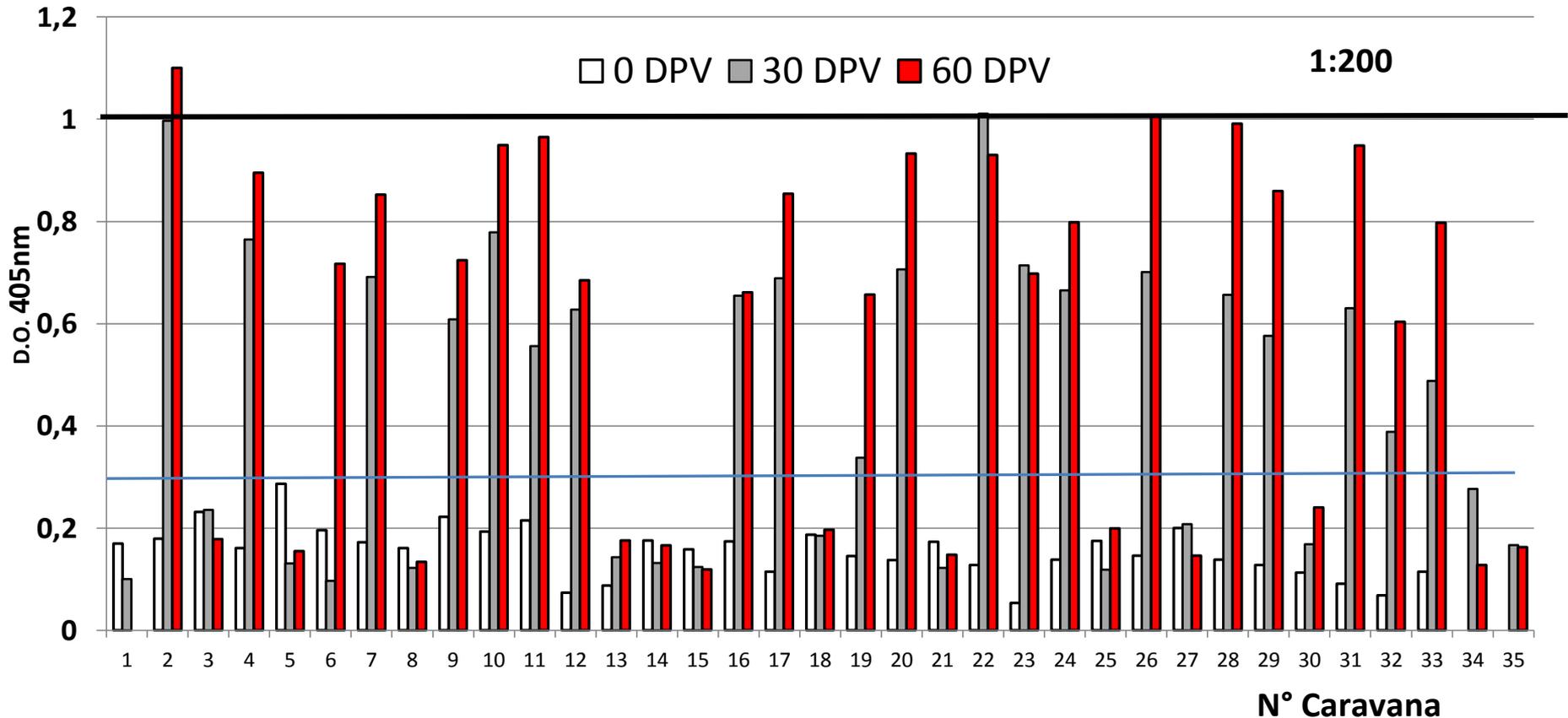
Back-transformed data - trials 1-3



Se asocia con un alto grado de protección que una cierta proporción del grupo de ovinos vacunados presente una absorbancia de anticuerpos cercana o mayor a 1,0 y por lo tanto se podría inferir que la vacuna estaría correctamente formulada y garantizando su buena calidad.

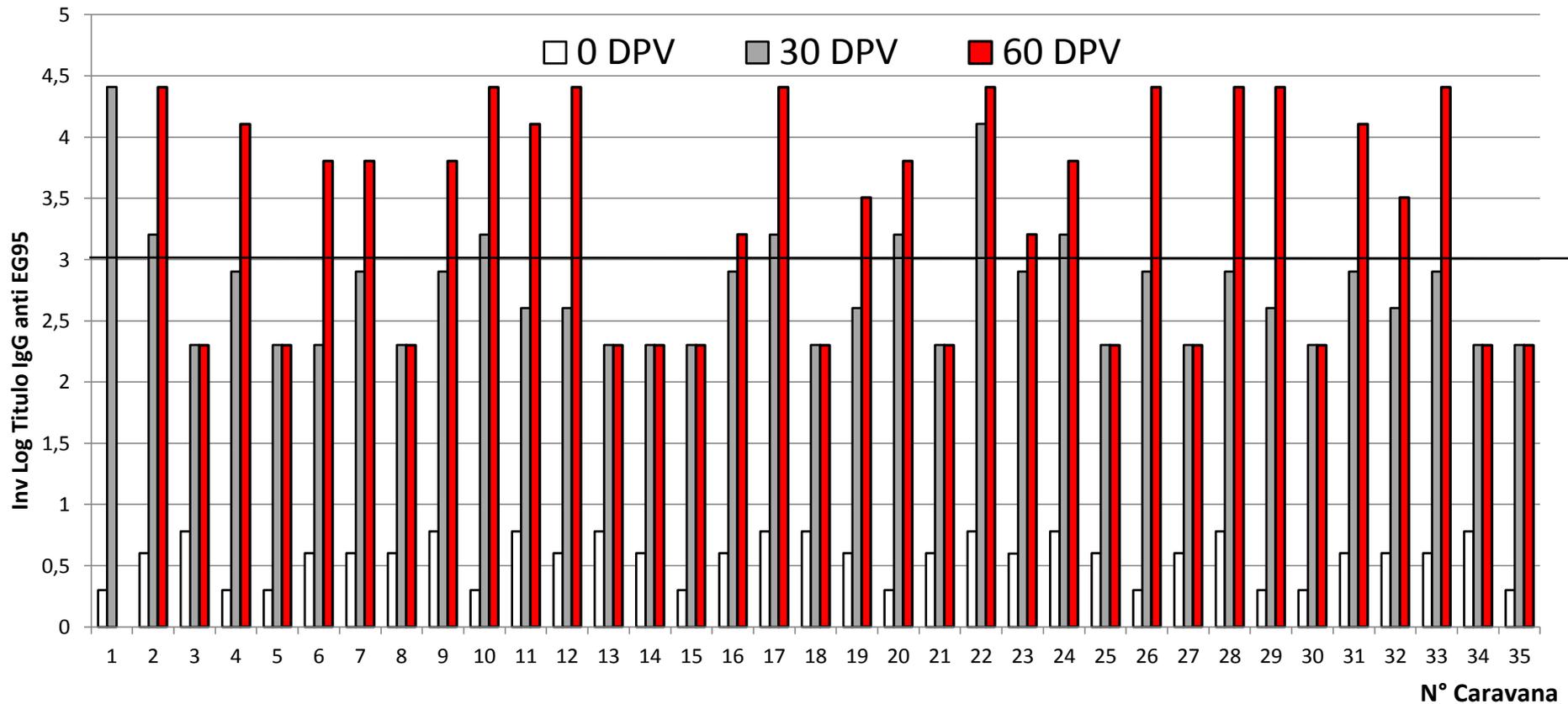
MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN

Camelidos Sudamericanos (Lama glama)



MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN

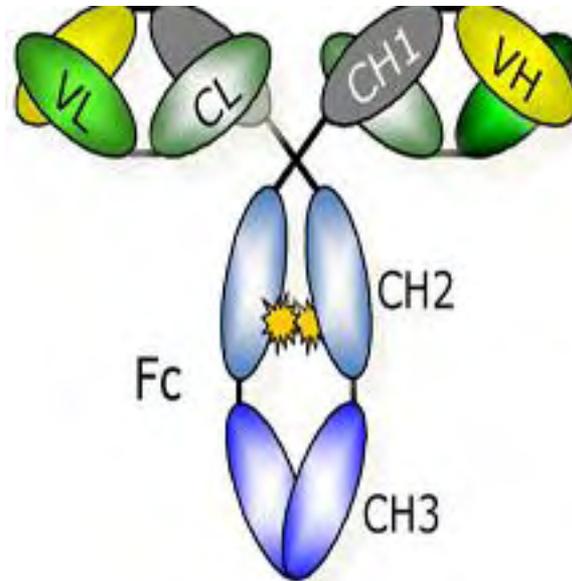
Camelidos Sudamericanos (Lama glama)



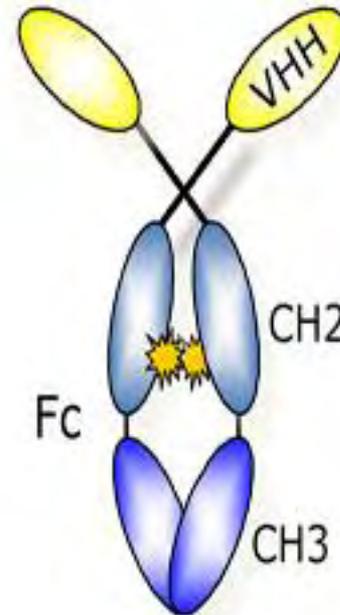
ICT Miltein-CONICET/Sec Salud Chubut/ INTA-Abra Pampa 2012

MONITOREO SEROLÓGICO DE HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS E INMUNIDAD CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN

Camelidos Sudamericanos (*Lama glama*)



IgG



IgG camelidos



Orientación hacia métodos alternativos a la experimentación con animales

RRR

(reduction, replacement and refinement)

Test de inactivación de oncoesferas activadas





Huevos de *Taenia Hydatigena* 10X



Huevos de *Taenia Hydatigena* 40X



Huevos de *Taenia Hydatigena* 100X



Oncosfera activada. Tinción Trypan Blue

Conclusiones

Se propone:

- El desarrollo y validación de nueva tecnología destinada al monitoreo de anticuerpos vacunales anti-EG95 en ovinos y caprinos aplicable en los ensayos a campo.
- Con el objetivo de contribuir al sistema de vigilancia epidemiológica y a demostrar la potencia de la vacuna Providean Hidatil EG95.

***En el marco del Plan Nacional de Hidatidosis**

Conclusiones :

- Nuestros resultados muestran que la inmunogenicidad de la formulación oleosa conteniendo 50 µg/dosis de proteína recombinante EG95 fue demostrada y la vacuna hoy es producida en Argentina como: Providean Hidatil EG95, y es equivalente a la formulación Australiana desarrollada por AgResearch y la Universidad de Melbourne.



Conclusiones finales :

- La inclusión de ésta herramienta práctica en un programa de control de hidatidosis permitirá prevenir la enfermedad en hospederos intermediarios a través de la seroprotección inducida y la subsecuente reducción de la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los perros, posibilitando así la disminución del riesgo de contraer la enfermedad a la población.

Conclusiones finales :

El cumplimiento de los objetivos del proyecto de diseño y producción de kits para el monitoreo vacunal en ovinos/caprinos y camelidos permitirá a nuestro país :

- ◆ Implementar las estrategias y procedimientos de la norma técnica en materia de vigilancia y monitoreo de inmunidad.
- ◆ Generar resultados confiables y aceptables por terceras partes, a través de la implementación de normas de calidad en laboratorios de diagnóstico y control, la aplicación de técnicas reconocidas internacionalmente, adecuadamente validadas por personal altamente capacitado.
- ◆ Implementar un sistema operativo para el control de la enfermedad y así generar mayor información sobre estatus sanitario de nuestra ganadería.



THE UNIVERSITY OF
MELBOURNE



Grupo de Investigadores Responsables

Dra. Verónica Poggio
Dr. Osvaldo Periolo
Dra. Cristina Seki
Dra. Blanca Robiolo

Director: Dr. José La Torre

Grupo de Colaboradores

Lic. Juan Serafino
Tec. Carmen de Vincenzo
Tec. María Delgado
Tec. Horacio Descoins