

TITULO: PRODUCCION Y EVALUACION DE UNA VACUNA ORAL DE Pasteurella multocida.

AUTORES: Munguía* Q.E.D., Alvarez de la Cuadra, J. y Ciprián C.A.

INSTITUCION: Coordinación de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán -UNAM.

AREA: Sanidad Animal.

*Becaria del CONACyT.

Introducción.

La vacunación contra bacterias que afectan el tracto respiratorio del cerdo ha sido intentada con frecuencia, pero con resultados poco alentadores. En el caso específico de vacunas de Pasteurella multocida, es probablemente debido a que: a) las bacterinas parenterales estimulan poca IgA secretora, b) los adyuvantes utilizados son poco estimulantes, c) las bacterias utilizadas no son de los serotipos adecuados, d) se utilizan demasiados antígenos diferentes en la misma vacuna, y e) las bacterias usadas no expresan en forma óptima los antígenos protectivos.

Aunque la prevención de pasteurelisis pulmonar se ha intentado por muchos años, su escaso éxito ha aumentado el interés de obtener vacunas vivas que se apliquen por vía oral.

Para intentar elaborar una vacuna de células vivas que sea aplicada por vía oral, que logre estimular placas de Peyer y mantenga una respuesta inmunitaria de tipo IgA secretora, es necesario cumplir con tres requisitos: a) células viables, b) un soporte que permita llegar a las bacterias a intestino y que tenga afinidad por células M, y c) la utilización de un buen adyuvante (Bourne et al., 1971; Husband, 1977 y Brandtzaeg y Bjerke, 1989).

Para la elaboración de una vacuna viva, con estas características, se realizaría por medio de la inmovilización (Kennedy, 1983). de células completas sobre una resina (biopolímero), lo que nos proporcionarían un inmunógeno para ser aplicado por vía oral.

La resina con células inmovilizadas, por un lado proporcionaría microorganismos viables, ya que el método químico de acoplamiento es a través de grupos químicos localizados en la pared celular bacteriana, lo que permitiría mantener intacta el resto de la superficie y por otro lado, los microorganismos se mantendrían en un aglomerado que los protegería de la desintegración por el pH estomacal, permitiendo así su llegada a intestino. La resina por sí misma actuaría como adyuvante.

Objetivos

1.- Producir y evaluar una vacuna contra P. multocida con mejores características inmunogénicas que las convencionales.

2.- Evaluar la respuesta inmune empleando un modelo experimental con conejos.

Materiales y Métodos

- 1) Pasteurella multocida D dermonecrotóxica aislada de cerdo.
- 2) Resinas de intercambio iónico.
- 3) Acoplantes químicos.
- 4) 12 conejos libres de P. multocida, divididos en 4 grupos:
 - I. Control. 3 conejos sin tratamiento.
 - II. Vacunados por vía oral. 3 conejos.
 - III. Vacunados vía aerosol. 3 conejos.
 - IV. Vacunados vía IM con vacuna comercial. 3 conejos.
- 5) Suero hiperinmune contra P. multocida.
- 6) Suero conjugado con Fluoresceína anti-IgG conejo.
- 7) Suero anti-IgA conejo.
- 8) Suero conjugado con TRITC anti-IgG cabra.

I. Obtención de la vacuna oral. Con el fin de establecer las condiciones óptimas de acoplamiento, entre el biopolímero y P. multocida, se probaron 3 resinas de intercambio iónico, y se variaron las condiciones de la reacción, valorándose los resultados por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

II. Una vez obtenido el conjugado, se procedió a evaluar las propiedades adhesivas del mismo, en intestino de conejo, administrado por vía oral y directamente en intestino en asa ligada, valorándose por microscopía electrónica de barrido.

III. Evaluación de la respuesta inmune en un modelo experimental con conejos:

1. Inmunización de los 4 grupos de conejos.
2. Obtener cortes en crióstato de 2 a 3 μ de pulmón e intestino.
3. Determinación de células productoras de IgG e IgA por inmunofluorescencia.

Resultados y Discusión

En la primera etapa se obtuvo la vacuna oral (conjugado inmovilizado), en donde se llevó a cabo un acoplamiento químico entre CM celulosa y P. multocida. Una vez obtenido el conjugado se constató su adherencia al epitelio intestinal.

La proporción relativa de células productoras de IgG e IgA se ilustran en los cuadros 1 y 2 respectivamente. En estos resultados podemos observar que la cantidad de células con marcadores tanto para IgG e IgA, depende directamente de la vía de inoculación, es decir, que para obtener respuesta inmune en tracto respiratorio son mucho más eficaces la vía aerosol y la oral. En cuanto a la vía oral, se puede observar que es posible llevar a cabo una inmunización de una membrana mucosa como el intestino (Ogra et al., 1989), logrando la protección de otra membrana distante como el tracto respiratorio; lo cual concuerda con el concepto de un sistema mucosal común por lo tanto resultan evidentes las ventajas de la vacunación oral.

	7	14	21
Intestino IM	+	+	+
Pulmon IM	+	+	+
Intestino Oral	+	+	+
Pulmon Oral	-	+	+
Intest. Aerosol	+	++	++
Pulm. Aerosol	++	++	+++
Intest. Control	-	+/-	+/-
Pulmon Control	+/-	+/-	+/-

CUADRO 1. Proporción de células productoras de IgG.

	7	14	21
Intestino IM	+	+	+
Pulmon IM	+	+	+
Intestino Oral	++	+++	++++
Pulmon Oral	++	+++	+++
Intest. Aerosol	++	++	+++
Pulmon Aerosol	+	+	+
Intest. Control	+	+	+
Pulmon Control	+/-	+/-	+/-

CUADRO 2. Proporción de células productoras de IgA.

Bibliografía

- 1.- Brandtzaeg, P. and Bjerke, K. (1989). Human Peyer's Patches: Lympho-Epithelial Relationships and Characteristics of Immunoglobulin-Producing Cells. *Immunological Investigations*, 18 (1-4), 29-45.
- 2.- Bourne, F.J., Pickup, J. y Honeur, J.W.: Intestinal immunoglobulins in the pig. *Biochem. Biophys Acta*, 229, 18-25 (1971).
- 3.- Husband, A. Immunity in the intestine. *The Vet. Bull.* 48 (11), 911-923 (1977).
- 4.- Kennedy, J.F. Immobilized living cells and their applications. *App. Bioch. Bio.* 4 (11-47), 1983.
- 5.- Ogra, P.L.; Okamoto, J.; Freiherst, L.J.; LaScolea, Jr. and Merrick, J.M. (1989). Immunization of the gastrointestinal tract with bacterial and viral antigens: implications in mucosal immunity. *Immunological Investigations*, 18 (1-4), 559-570.