

Desarrollo de una vacuna inactivada contra la epidermitis exudativa porcina utilizando dos adyuvantes

Development of an inactivated vaccine against porcine exudative epidermitis using two adjuvants

Gonzalo Picatto¹ , Luciana Fassola^{1,2}, Alejandro Lozano¹, Norma Pereyra³, Valentina Cane³, Julia Cane³, Ramiro Andreola¹, Tomás Mandrile¹, Francisco Vassallo¹, Luis Calvino¹, Jordana Auad¹

1. Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias

2. Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)/Universidad Católica de Córdoba (UCC), Argentina

3. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario

Correspondencia: Jordana Auad. email: jordana.auad@ucc.edu.ar

Resumen

Staphylococcus hyicus es el agente responsable de provocar la Epidermitis exudativa, una afección de la piel que afecta a los lechones lactantes y destetados menores de 6 semanas de edad. Esta patología se caracteriza por generar lesiones con exudación grasa, descamación y la formación de vesículas. A nivel global presenta una alta incidencia, con una variabilidad en la morbilidad del 20% al 100%, mientras que la mortalidad oscila entre el 50% y el 75%.

En Argentina no se dispone actualmente de una vacuna que prevenga esta enfermedad, a pesar de que la inmunización se ha mostrado como una estrategia efectiva en la prevención de los procesos infecciosos en animales. Por lo tanto, el objetivo central de este estudio fue desarrollar dos bacterinas autógenas dirigidas contra *Staphylococcus hyicus*. Una de estas bacterinas se formuló utilizando un adyuvante convencional (hidróxido de aluminio), mientras que la otra utilizó el adyuvante inmunoestimulante (ISPA). La vacuna se empleó para inmunizar a cerdas preñadas, que fueron agrupadas según el adyuvante utilizado en la inmunización.

La evaluación clínica se centró en determinar la tolerancia de las cerdas a las bacterinas. El resultado de esta evaluación fue exitoso, lo que marca un paso importante en la investigación y el desarrollo de medidas preventivas ante la Epidermitis exudativa.

Palabras claves: *Staphylococcus hyicus*, vacunas, ISPA, Al(OH)₃.

Abstract

Staphylococcus hyicus is the agent responsible for causing Epidermitis exudativa, a skin condition that affects suckling and weaned piglets under 6 weeks of age. This pathology is characterized by generating lesions with fatty exudation, desquamation and the formation of vesicles. Globally, it has a high incidence, with a variability in morbidity from 20% to 100%, while mortality ranges between 50% and 75%.

In Argentina there is currently no vaccine available to prevent this disease, despite the fact that immunization has been shown to be an effective strategy in the prevention of infectious processes in

animals. Therefore, the central objective of this study was to develop two autogenous bacterins directed against *Staphylococcus hyicus*. One of these bacterins was formulated using a conventional adjuvant (aluminum hydroxide), while the other used the immunostimulating adjuvant (ISPA). The vaccine was used to immunize pregnant sows, which were grouped according to the adjuvant used in immunization. The clinical evaluation focused on determining the tolerance of the sows to the bacterins. The results of this evaluation were successful, which marks an important step in the research and development of preventive measures against Exudative epidermitis.

Keywords: *Staphylococcus hyicus*, vaccines, ISPA, Al (OH)₃.

Introducción

La Epidermitis exudativa es una enfermedad cutánea cuyo agente etiológico es *Staphylococcus hyicus*, caracterizada por producir exudación grasa, exfoliación y formación de vesículas¹. Afecta a lechones lactantes y destetados de menos de 6 semanas de edad, con una incidencia máxima en lechones menores a una semana. Esta enfermedad ha sido descrita en la mayoría de los países productores de cerdos, presentando a nivel mundial una morbilidad del 20 al 100% y mortalidad del 50 al 75%². En Argentina, actualmente no existe una vacuna contra la Epidermitis exudativa, a pesar de que la vacunación es la estrategia más efectiva para prevenir, controlar y erradicar enfermedades infecciosas en animales. En este contexto, se ha desarrollado un adyuvante innovador denominado ISPA (partículas inmunoestimulantes), compuesto por lípidos de dipalmitoil-fosfatidilcolina, colesterol, esterilamina, alfa-tocoferol y saponina QuilA³. Estas partículas además de su alta seguridad, estabilidad y tolerabilidad, desencadenan una respuesta equilibrada TH1, TH2 y una respuesta celular citotóxica. El objetivo de este trabajo fue formular dos bacterinas autógenas contra *Staphylococcus hyicus* para las cuales se empleó un adyuvante convencional (Al(OH)₃) y uno de nueva generación (ISPA) y evaluar la tolerabilidad clínica de ambos inmunógenos en hembras preñadas. Por otra parte, se describe la toma de muestras que permitirá la evaluación de la respuesta inmune de las hembras preñadas inmunizadas y la transferencia de la inmunidad a los cachorros.

Materiales y métodos

Formulación del inmunógeno.

A partir de muestras tomadas de lesiones de piel de lechones muertos por epidermitis exudativa se tomaron muestras y fueron sembradas en agar sangre en aerobiosis. Las colonias sospechosas de *Staphylococcus* fueron aisladas e identificadas por metodología fenotípica³. Cepas de

Staphylococcus hyicus y *Staphylococcus* spp. se utilizaron para formular una vacuna experimental. Las cepas seleccionadas se cultivaron por 18 hs en caldo triptosa soya y se inactivaron con formol al 0,5% durante 24 horas a 37°C, ajustándose la turbidez con solución fisiológica estéril al tubo N° 3 de la escala Mc Farland (aprox. 9×10^8 ufc/ml). A partir de este inmunógeno se generaron dos formulaciones incorporando distintos adyuvantes: una formulación incluyó gel de hidróxido de aluminio (AlhydrogelTM) al 15% (vol/vol), incubando 1 hora a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm para permitir la adsorción entre gel y los microorganismos. La segunda formulación incluyó un adyuvante inmunoestimulante (ISPA) a razón de 500 µl cada 850 µl de la suspensión bacteriana⁴. Ambas formulaciones fueron sometidas a pruebas de esterilidad a partir de siembra en caldo tioglicolato, incubándose durante 48 hs para su posterior almacenamiento en frío hasta su utilización.

Consideraciones bioéticas: el proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad De Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. (V-14/2021).

Población a estudiar

Porcinos: cerdas madres y sus cachorros de línea genética DanBred pertenecientes a la granja Vasallo, de la localidad de Montecristo, provincia de Córdoba, Argentina.

Esquema de inmunización

Todas las hembras fueron inmunizadas en el último tercio de la gestación. Al finalizar la preñez se registraron los lechones de cada camada.

Grupo 1 (Grupo Control): Ocho hembras inmunizadas con una solución salina (control negativo).

Grupo 2: Ocho hembras inmunizadas con la vacuna inactivada de *St. hyicus*, complementada con un adyuvante de Al(OH)₃.

Grupo 3: Ocho hembras inmunizadas con la vacuna inactivada de *St. hyicus*, con ISPA como adyuvante.

La administración de la vacuna se realizó por vía subcutánea. Se administraron 3 ml de la vacuna en la primera dosis, a las 5 semanas preparto y 3 ml en la segunda dosis, 2 semanas preparto, considerando un período de gestación de 114 días.

Tolerabilidad clínica

Se evaluó la tolerabilidad clínica en base a la presencia de edema, granuloma y temperatura local y sistémica.

Toma de muestras

El muestreo se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente esquema:

Hembras preñadas: Se tomó una muestra de sangre por punción de la vena yugular en tres momentos: antes de la inmunización, 21 días después de la primera inmunización y en el momento del parto.

Lechones: Se obtuvieron muestras de sangre 48 a 72 horas después del nacimiento y a los 21 días posparto (destete). Una tercera muestra se tomó a los 72 días (recrea) después del nacimiento.

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Inmunología, perteneciente al Área de Diagnóstico del Hospital Veterinario de la Universidad Católica de Córdoba.

Procesamiento de muestras

Se centrifugaron las muestras de sangre a 1000 x g durante 10 minutos para separar el suero y se transfirió a tubos eppendorf previamente identificados.

Las muestras de calostro también fueron centrifugadas a 13,800 x g durante 10 minutos, y los sobrenadantes resultantes se almacenaron hasta su procesamiento.

Las muestras se conservaron a -80°C para preservar la integridad de los componentes inmunológicos.

Resultados y discusión

Se logró formular una vacuna inactivada utilizando cepas locales de *Staphylococcus hyicus* con dos adyuvantes. Por un lado, se empleó un adyuvante utilizado ampliamente en

veterinaria Al(OH)₃⁵ y, por otro lado, el adyuvante ISPA⁴. Este último fue usado por primera vez en la especie porcina. Demostró ser clínicamente bien tolerada en las hembras preñadas, donde no presentaron efectos sistémicos ni locales. Actualmente se están analizando las muestras para evaluar la respuesta inmune específica de anticuerpos, teniendo en cuenta las subclases de IgG inducidas y la transferencia en el binomio madre-cría.

La formulación de una vacuna inactivada con adyuvante ISPA representa un paso significativo contra la Epidermitis exudativa. La inclusión de cepas de circulación local podría aumentar la relevancia biológica y la eficacia de la vacuna al adaptarse al perfil genético de las cepas endémicas.

Conclusión

El desarrollo de una vacuna inactivada, sin efectos adversos con cepas locales de *Staphylococcus hyicus* fue llevado a cabo con éxito.

Bibliografía

1. Wang L, Wu Z wei, Li Y, Dong J guo, Zhang L yi, Liang P shuai, et al. Profiling and Identification of Novel Immunogenic Proteins of *Staphylococcus hyicus* ZC-4 by Immunoproteomic Assay. Cao Y, editor. *PLoS ONE*. 8 de diciembre de 2016;11(12):1-15.
2. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hincheliff K. Enfermedades causadas por bacterias-I. En: Medicina Veterinaria Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9na ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002. p. 850-3.
3. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotsuki S, et al. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive *Staphylococci*. *J Clin Microbiol*. marzo de 2010;48(3):765-9.
4. Bertona, Daiana, et al. Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69.10 (2017): 1293-1303.

5. Fontaine MC, Baird G, Connor KM, Rudge K, Sales J, Donachie W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain pseudotuberculosis. *Vaccine*. 14 de agosto de 2006;24(33-34):5986-96.

