

# PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARA LA CONTRATACIÓN DEL ESTUDIO DEL MODELO DE INFECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y LA EFICACIA DE VACUNAS ANTITUBERCULOSAS EN CORDEROS DESAFIADOS CON *MYCOBACTERIUM BOVIS*

---

## 1. Resumen

**TÍTULO:** Estudio del modelo de infección y evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en corderos desafiados con *Mycobacterium bovis*

**RESUMEN:** El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia de la vacuna BCG (cepa danesa) y de una vacuna basada en un preparado inactivado de *M. bovis* (EMDIAR) en corderos (*Ovis aries*) desafiados experimentalmente por la vía endobronquial con una cepa de campo *Mycobacterium bovis*, así como estandarizar la respuesta inmune frente a la vacunación, y el modelo de infección experimental con *M. bovis* en la especie de destino.

El estudio implicará 18 corderos de 2-3 meses de edad, distribuidos al azar en tres grupos de tratamiento de 6 animales: grupo vacunado con BCG ( $\sim 5 \times 10^5$  UFC), grupo vacunado con la vacuna inactivada ( $\sim 6 \times 10^6$  UFC) y grupo control no vacunado. A las 6 semanas tras la vacunación, todos los animales serán trasladados a la Unidad de Nivel 3 de Bioseguridad del IRTA-CReSA donde, tras una semana de aclimatación, se desafiaron con  $\sim 1000$  UFC de una cepa virulenta de campo *M. bovis* por vía endobronquial.

Los animales se observarán para síntomas de shock durante las 2 horas post-inoculación de las vacunas y del inóculo de *M. bovis* y para reacciones locales y sistémicas anómalas durante los 7 días posteriores a las inoculaciones. Se registrará la temperatura antes de las inoculaciones y a las 4, 12, 24, 48 y 72 horas y semanalmente después del desafío. Durante todo el estudio (21 semanas) se registrará cualquier evento adverso.

Cada 2 semanas, durante todo el estudio, se recogerán muestras de sangre con heparina para el estudio de parámetros inmunológicos (cuantificación de citoquinas por ELISA y citometría y detección de anticuerpos específicos frente a complejo *M. tuberculosis*).

A las 12 semanas tras el desafío experimental se procederá a la inoculación de las tuberculinas PPD bovina y aviar. A las 72h después de la inoculación de las tuberculinas se realizará la lectura de la intradermoreacción. A las 14 semanas tras el desafío experimental se realizará la necropsia y posteriormente se realizará una evaluación cuantitativa de la patología. También se realizará un cultivo cuantitativo de Micobacterias a partir de los nódulos linfáticos respiratorios.

## 2. Organización del estudio

---

**Título:** Estudio del modelo de infección y evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en corderos desafiados con *Mycobacterium bovis*

---

### Personal

Director de Estudio:

Bernat Pérez de Val (IRTA)  
Edifici CReSA. Campus UAB  
08193 Bellaterra (Barcelona), Spain  
Tel: +34 93 467 40 40 Ext.: 1729  
Email: [bernat.perez@irta.cat](mailto:bernat.perez@irta.cat)

Promotor:

Ana M<sup>a</sup> Balseiro (SERIDA)  
Camino de Rioseco 1225, La Olla-Deva  
33394 Gijón (Asturias) Spain  
Tel: +34 984502010  
Email: [abalseiro@serida.org](mailto:abalseiro@serida.org)

### Equipo investigador y responsabilidades:

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| • Preparación de los inóculos:                                    | Bernat Pérez de Val (IRTA)           |
| • Inoculación de <i>M. bovis</i> :                                | Xavier Moll (UAB)                    |
| • Inoculación de vacunas y tuberculinas:                          | David Solanes (IRTA)                 |
| • Lectura de la intradermoreacción:                               | David Solanes (IRTA)                 |
| • Técnicas inmunológicas:   | Bernat Pérez de Val (IRTA)           |
| • Alojamiento y mantenimiento de corderos en granja experimental: | Francisco Pérez (SyBA)               |
| • Alojamiento y mantenimiento de cabritos en el CReSA:            | David Solanes (IRTA)                 |
| • Necropsia e histopatología:                                     | Ana M <sup>a</sup> Balseiro (SERIDA) |
| • Cultivo de micobacterias:                                       | Bernat Pérez de Val (IRTA)           |
| • Análisis estadístico:   | Bernat Pérez de Val (IRTA)           |

### Localización del estudio:

Granja experimental de SyBA SL (Llerona, Vallès Oriental). Código REGA: ES080860011549.  
Estabulario de la Unidad de Biocontención de Nivel 3 del IRTA-CReSA

### Planificación temporal:

Fecha de inicio de la fase experimental en animales: 01/02/2016

Fecha de fin de la fase experimental en animales: 07/06/2016

Fecha de fin de la fase de laboratorio: 09/09/2016

Fecha de prevista de entrega del informe final del estudio: 30/11/2016

El presente estudio forma parte del proyecto de investigación “Estrategias de control de la tuberculosis bovina en reservorios silvestres (tejón y jabalí) y domésticos (ovino)”, cuya investigadora principal es Ana M<sup>a</sup> Balseiro (SERIDA, Asturias).

### 3. Introducción

La tuberculosis (TB) caprina es una enfermedad bacteriana crónica, de carácter zoonótico, causada, principalmente, por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*. La vacuna viva atenuada *M. bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) es la única vacuna disponible frente a la tuberculosis humana y bovina. El Manual de la OIE detalla en el capítulo 2.4.7 los requerimientos que han de cumplir las vacunas frente a la infección por *M. bovis*. Las cabras parecen ser animales altamente susceptibles a la enfermedad pudiendo actuar como reservorios domésticos y generando problemas en programas de erradicación de tuberculosis en bovinos. En este estudio se evaluará la seguridad y la eficacia de dos vacunas antituberculosas en ovinos: BCG y un preparado de *M. bovis* inactivado (EMDIAR) [1]. Se aplicarán métodos inmunológicos para valorar la inmunogenicidad de las vacunas y métodos anatomopatológicos y bacteriológicos para valorar la protección y la capacidad para reducir la patología y la carga bacteriana frente a una cepa de campo patógena de *M. bovis*. El estudio en corderos de 2-3 meses de vida, negativos a la prueba del interferón-gamma (IFN- $\gamma$  y seronegativos a paratuberculosis), se llevará a cabo en un box de la granja experimental y en un box de aislamiento de la Unidad de Biocontención de Nivel 3 del IRTA-CReSA.

### 4. Objetivos

El objetivo general de este estudio es desarrollar un modelo de infección experimental de TB en ovino y estudiar la seguridad y eficacia de 2 vacunas en este modelo.

Los objetivos específicos de este estudio son:

- Estudiar el modelo de infección endobronquial con *M. bovis* en corderos.
- Evaluar la seguridad de 2 vacunas frente a TB en ovinos: La vacuna BCG (cepa Danesa) y la vacuna EMDIAR.
- Estudiar la respuesta inmune celular y humoral en respuesta a 2 vacunaciones activas frente a TB y en respuesta al desafío con una cepa de campo de *M. bovis*.
- Evaluar la protección conferida por ambas vacunas (ausencia de infección o reducción de la patología y/o la carga bacteriana).

### 5. Protocolo técnico

El calendario general del estudio se muestra en el Anexo 1. Los diferentes procedimientos a realizar con las muestras recogidas, se detallan a continuación.

## 5.1. Diseño experimental

Se vacunarán 6 corderos con BCG, otros 6 con EMDIAR y 6 más se mantendrán como control no vacunado. Todos los animales se desafiarán experimentalmente con un aislado de campo de *M. bovis*. La respuesta inmunológica frente a *M. bovis* durante el curso de la infección será monitorizada con técnicas inmunológicas y moleculares, y el estado de infección será a su vez determinado mediante necropsia, histología, detección molecular y cultivo bacteriológico del punto de inoculación y linfonodos de drenaje.

Los grupos de tratamiento se muestran en el siguiente cuadro:

Grupo	Vacunación		Desafío
	BCG	EMDIAR	<i>M. bovis</i>
Grupo 1 (N = 6)	X		X
Grupo 2 (N = 6)		X	X
Grupo 3 (N = 6)			X

## 5.2. Animales

El estudio se realizara con 18 corderos, de raza ripollesa, de 2-3 meses de vida y destetados en el momento de la vacunación con BCG (Semana 0). Los animales procederán de una granja libre de tuberculosis de y serán negativos a tuberculosis/paratuberculosis (mediante la prueba del IFN- $\gamma$  y detección de anticuerpos). Se alojarán para su aclimatación en boxes aislados de la granja experimental localizada en Llerona (Vallès Oriental, Cataluña), hasta la semana 6 y posteriormente serán trasladados al estabulario de la Unidad de Biocontención de nivel 3 del IRTA-CReSA para la inoculación experimental con *M. bovis*.

### 5.2.1. Criterios de inclusión

Corderos sanos, hembras, de 2-3 meses de vida en el momento de iniciar el experimento. Durante los días de aclimatación (4-7 días) los animales no han de mostrar signos clínicos, ni elevaciones de la temperatura corporal.

### 5.2.2. Criterios de exclusión

- Animales considerados no aptos en el momento de la inoculación de *M. bovis*, de acuerdo con la evaluación del Director de Estudio en base a los registros de observación.

- Animales que desarrollen en el curso del estudio cualquier afección, diferente a TB, la cual sea probable que cause sufrimiento o pérdida del buen estado del animal o requiera tratamiento antibiótico que interfiera con el desarrollo de la infección por micobacterias, tratamiento con corticosteroides o antiinflamatorios durante el estudio.

### **5.2.3. Identificación**

Cada animal presentará dos crotales, uno en cada oreja, para poder ser identificado de modo individual.

### **5.2.4. Justificación del número de animales**

El número de animales a emplear en este estudio será el mínimo necesario que permita hallar diferencias entre grupos de tratamiento mediante un estudio estadístico.

### **5.2.5. Alojamiento y manutención**

Los animales se mantendrán en un box experimental que. En la Unidad de Biocontención del IRTA-CReSA, el box será hermético, con aire filtrado (HEPA) de entrada y salida, sobre slat comercial, en una superficie útil de 11 m<sup>2</sup>. Los animales vacunados (n=12) y los 6 animales controles se alojarán en el mismo box. Los animales serán alimentados siguiendo procedimientos habituales de granjas convencionales, según PNT IRTA-CReSA PE NBS 004, con suministro de agua *ad libitum*.

Cualquier enfermedad intercurrente que presenten los animales será registrada, así como la administración de cualquier medicamento durante el estudio, que requerirá la autorización expresa del director del estudio.

## **5.3. Vacunación**

### **5.3.1. Bacilo Calmette-Guérin (BCG)**

Se utilizará la cepa Danesa de *M. bovis* BCG (ATCC® 35733™). Se reconstituirá la vacuna siguiendo las instrucciones del proveedor. Se subcultivará en medio Middlebrook 7H9, según lo descrito en [2] y se preparará una suspensión de 10<sup>6</sup> UFC/ml, administrada por vía subcutánea en dosis de 500 µl (5×10<sup>5</sup> UFC), según lo recomendado por el Manual de la OIE para requerimientos de vacunas de TB [3].

### 5.3.2. Preparado inactivado de *M. bovis* (EMDIAR)

Se utilizará la cepa de campo de *M. bovis* aislada de una lesión tuberculosa en jabalí e inactivada según el procedimiento descrito en [1]. Se administrará una dosis de  $\sim 6 \times 10^6$  UFC/ml.

### 5.3.3. Vía de inoculación de las vacunas

Se inoculará 0,5 ml de BCG por vía subcutánea (axila) y 1 ml del EMDIAR por vía intramuscular (músculo braquicefálico izquierdo).

Grupo de tratamiento y Nº de animales	Vacuna	Vía de administración	Dosis	Volumen
Grupo 1 / 6 animales	BCG	subcutánea	$5 \times 10^5$ UFC	0,5 ml
Grupo 2 / 6 animales	EMDIAR	intramuscular	$6 \times 10^6$ UFC	1 ml

## 5.4. Inoculación de *Mycobacterium bovis*

### 5.4.1. Inóculo de *M. bovis*

Para infectar a los animales se utilizará una cepa de campo de *M. bovis* con perfil spoligo XXXX (Denominación internacional según [www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org)). La bacteria será cultivada en los Laboratorios NBS3 del CReSA según PNT PE MI 025. La suspensión se preparará a partir de cultivos frescos a una concentración de entre 1000 i 2000 UFC por 0,5 ml de PBS.

### 5.4.2. Vía de inoculación de *M. bovis*

Los corderos serán anestesiados con xylazina v.i. a 10mg/50kg (Xilagesic 2%, Carlier, Barcelona, Cataluña, España), posteriormente se colocarán en decúbito lateral derecho y serán inoculados por vía endobronquial. Cada animal recibirá 0,5 ml de la suspensión de *M. bovis* en una única aplicación. Se seguirá el procedimiento descrito en [4].

Grupo de tratamiento y Nº de animales	Inóculo	Vía de administración	Nº células/ volumen
Todos los grupos/18 animales	<i>Mycobacterium bovis</i> SBXXX (aislado de campo, Localidad, CCAA)	endobronquial	1000-2000 UFC/0,5 ml

## 5.5. Pruebas inmunológicas

### 5.5.1. Ensayo de liberación de interferón-gamma (IGRA) en sangre completa

Las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 realizará un IGRA con muestras de sangre de todos los animales según el procedimiento descrito en Pérez de Val *et al.*, 2011 [4]. Se estimulará la sangre completa (extraída en tubos de heparina) con los siguientes antígenos: PPD bovina (20 µg/ml, CZV), PPD aviar (20 µg/ml, CZV) y ESAT-6/CFP-10 (10 µg/ml, Lionex). Las muestras también se estimularán con el mitógeno PWM (10 µg/ml Sigma-Aldrich) como control positivo y el control negativo de estimulación se obtendrá añadiendo solución salina tamponada (PBS) a las muestras. Las muestras, con cada uno de los estímulos, se incuban en placas de cultivo celular durante 16-24h a 37 °C y 0,5 % de CO<sub>2</sub>. Seguidamente se separarán los plasmas y el IFN-γ liberado se determinará por ELISA empleando el kit Bovigam TB (Thermo Fisher Scientific, Prionics AG).

### 5.5.2. Citometría

De las muestras de sangre total extraídas las semana 17, se separarán 10 ml para realizar estudios citométricos. Se aislarán células mononucleares de sangre periférica (CMSP) siguiendo el PNT del CReSA PE CC 008. Las muestras de sangre se diluirán 1:1 con PBS y seguidamente se realizará una separación de las poblaciones celulares por gradiente de densidad por centrifugación, utilizando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Las CMPS obtenidas se suspenderán en medio de cultivo celular RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich), 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Posteriormente se contarán al microscopio con la ayuda de una cámara de Neubauer y serán procesadas por el Servicio de Citometría del CReSA haciendo uso del citómetro de flujo CR-0820 (FACS, Becton Dickinson) ubicado en los laboratorios NBS3 del CReSA. Se evaluarán las poblaciones celulares según lo descrito anteriormente [1]: células T reguladoras efectoras, células T reguladoras de memoria, células T productoras de IL-17A (Th17) y otras células T efectoras. Para este propósito se utilizarán anticuerpos específicos frente a CD3, CD4, CD25 y CD39 de bóvidos.

### 5.5.3. Intradermotuberculinización (IDTB)

Se realizará en la semana 17 del estudio según lo descrito en el manual de animales terrestres de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (Manual de la OIE 2009, Chapter 2.4.7 Bovine Tuberculosis). Primeramente, por medio de un pie de rey homologado, se realizará una lectura basal del grosor de la piel en las tablas del cuello (previamente rasurado) de los dos lados de cada animal. Las tuberculinas administrarán a una potencia mínima de 25.000 UI, inoculando 0,1 ml de cada tuberculina en la dermis de mesa del cuello (con una pistola Dermojet o con jeringa). Se administrará PPD bovina en el lado derecho de la tabla del cuello y PPD aviar en el izquierdo. La lectura de la intradermoreacción en cada esquina del cuello se realizará a las 72 h con el mismo pie de rey con que se hizo la lectura basal

### 5.5.4. Serología

A partir de plasma obtenido a las tomas de muestra de sangre total se realizará un ELISA indirecto de IgG frente a complejo *M. tuberculosis*. Concretamente frente al antígeno MPB83, siguiendo el procedimiento publicado previamente [4]

### 5.6. Necropsia

En la semana 19 todos los animales serán sacrificados con sobredosis de pentobarbital sódico administrado por vía intravenosa (0.7 mg por kg pv). Se realizará necropsia completa en la Sala de necropsias de la Unidad NBS3 del CReSA. En la necropsia se recogerán los nódulos linfáticos respiratorios (retrofaríngeos, mediastínicos caudal y craneales y traqueobronquial) que serán procesados para su estudio anatomopatológico y posteriormente bacteriológico. También se extraerán los pulmones que serán fijados en formalina tamponada al 10% según el protocolo publicado anteriormente [4].

### 5.7. Estudio anatomopatológico

Durante la necropsia se registrarán todas las lesiones tuberculosas observadas visualmente o por palpación en los diferentes órganos. Posteriormente un patólogo del IRTA-CReSA evaluará cuantitativamente la presencia de lesiones tuberculosas en los nódulos linfáticos respiratorios por fileteo y posterior medida del diámetro de los granulomas según el procedimiento publicado anteriormente [4]. Transcurrido un mínimo de un mes desde la fijación de los pulmones, éstos podrán salir de la Unidad NBS3 del CReSA. El estudio de lesiones pulmonares se realizará por Tomografía Axial Computerizada se realizará en el *Institut Germans Tries i Pujol*. La evaluación patológica de los pulmones se realizará según lo publicado en [4].

### **5.8. Cultivo cuantitativo de micobacterias**

Los nódulos linfáticos respiratorios, una vez evaluados anatomopatológicamente, serán enteramente procesados para cultivo cuantitativo de micobacterias. Cada linfonodo será pesado y homogeneizado enteramente en 10 ml de agua destilada estéril usando un homogeneizador (Masticator, IUL) y seguidamente los homogeneizados se trasladarán a tubos Falcon de 50 ml y se descontaminarán con 10ml de cloruro de hexadecilpiridinium (HPC) durante 15 minutos en agitación orbital. Posteriormente las muestras serán centrifugadas durante 30 minutos a 3500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810). El pellet será resuspendido con PBS con 10 ml 0,5% de Tween 80 y se realizarán 2 diluciones seriadas 1/10 en PBS Tween 80 de la suspensión madre. Se cultivará por duplicado 100 µl de las 3 suspensiones en placas de medio 7H11. Seguidamente se incuban las placas durante 28 días a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizará el recuento de colonias viables para conocer la carga bacteriana total en cada nódulo linfático y el conjunto de nódulos linfáticos respiratorios.

## **6. Gestión de residuos**

Todos los cadáveres serán destruidos por incineración después de la necropsia y la recogida de las muestras.

## **7. Evaluación de resultados y análisis de datos**

Los resultados clínicos, inmunológicos, patológicos y bacteriológicos serán evaluados durante toda la fase experimental por el Director del estudio con el apoyo del equipo investigador. Las comparaciones entre grupos experimentales se realizarán después de la fase experimental utilizando las pruebas estadísticas más adecuadas al parámetro objeto de evaluación (pruebas paramétricas o no paramétricas).

## **8. Informes**

El informe final del estudio será redactado por el Director del estudio con el apoyo del equipo investigador. Fecha esperada de entrega: 30/11/2016.

## **9. Modificaciones y desviaciones**

Cualquier modificación respecto este protocolo será pertinentemente notificada y justificada en el informe final. Sin embargo, el Director de estudio evaluará la necesidad de abrir cualquier desviación del protocolo que quedará pertinentemente reflejada y justificada en el informe final.

## 10.Registro y archivo de datos

Se procederá a la anotación de los datos en formato papel, mediante hojas informatizadas de registro de datos, como datos primarios dentro del box siendo finalmente trasladados a fichas en formato electrónico como copia de seguridad y para que el Director del estudio pueda ir observando la evolución del proceso. El IRTA-CReSA mantendrá durante 5 años una copia de todos los datos generados durante la fase experimental.

## 11.Bibliografía

1. Garrido JM, Sevilla IA, Beltran-Beck B, Minguíjon E, Ballesteros C, Galindo RC, Boadella M, Lyashchenko KP, Romero B, Geijo M V, Ruiz-Fons F, Aranaz A, Juste RA, Vicente J, de la Fuente J, Gortazar C: **Protection against Tuberculosis in Eurasian Wild Boar Vaccinated with Heat-Inactivated Mycobacterium bovis.** *PLoS One* 2011, 6:e24905.
2. Pérez de Val B, Vidal E, Villarreal-Ramos B, Gilbert SC, Andaluz A, Moll X, Martín M, Nofrarías M, McShane H, Vordermeier HM, Domingo M: **A Multi-Antigenic Adenoviral-Vectored Vaccine Improves BCG-Induced Protection of Goats against Pulmonary Tuberculosis Infection and Prevents Disease Progression.** *PLoS One* 2013, 8:e81317.
3. OIE: **Bovine tuberculosis.** *OIE Terr Man 2009 2009, Chapter 2.*
4. Pérez de Val B, López-Soria S, Nofrarías M, Martín M, Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Romera N, Escobar M, Solanes D, Cardona PJ, Domingo M: **Experimental Model of Tuberculosis in the Domestic Goat after Endobronchial Infection with Mycobacterium caprae.** *Clin Vaccine Immunol* 2011, 18:1872–1881.

## ANEXO 1. Cronograma del estudio

Calendario			Acción	Grupos experimentales		
				1 (N= 6)	2 (N= 6)	3 (N= 6)
Semanas	S0	29/01/2016	Entrada animales en Granja			
	S1	01/02/2016	Sangre y Peso			
			Vacunación	BCG	EMDIAR	
	S2					
	S3	15/02/2016	Sangre y Peso			
	S4					
	S5	29/02/2016	Sangre y Peso			
	S6	11/03/2016	Entrada animales CReSA			
	S7	14/03/2016	Sangre y Peso			
			Desafío experimental	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	S8					
	S9	29/03/2016	Sangre y Peso			
	S10					
	S11	11/04/2016	Sangre y Peso			
	S12					
	S13	25/04/2016	Sangre y Peso			
	S14					
	S15	09/05/2016	Sangre y Peso			
	S16					
	S17	23/05/2016	Sangre* y Peso			
		26/05/2016	IDTB Lectura IDTB			
	S18					
	S19	06/06/2016	Sangre y Peso			
06-07/06/2016		Necropsias				
07-08/06/2016		Cultivos				
S20						
S21						
S22						
S23	05/07/2016	Lectura cultivos				

\*Pruebas de citometría y producción de citoquinas.

Este estudio se realizará de acuerdo con el protocolo de estudio y según los principios de buenas prácticas de laboratorio y clínicas.

Villaviciosa, a 16 de noviembre de 2015.

EL JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN Y APOYO

Fdo: Fernando Andrés Villamil Chanlarro.

P.A. Carmen Díez Monforte.

Jefa Departamento de Investigación

