Distribuidor Autorizado:

Consultagro Vzla, C.A.

J-29884492-2

Vacuna contra **Brucelosis Bovina**

Delta-pgm

Protege a tu ganado y tu inversión con Delta-pgm

Para más información:

0286-961.40.99 / 0414-096.90.47

www.consultagro.com

Características de una vacuna ideal contra la brucelosis

No ser virulenta ni causar patologia en el bovino

Conferir un elevado nivel de protección contra la enfermedad

No generar interferencias con los tests serológicos usados en la vigilancia de la enfermedad

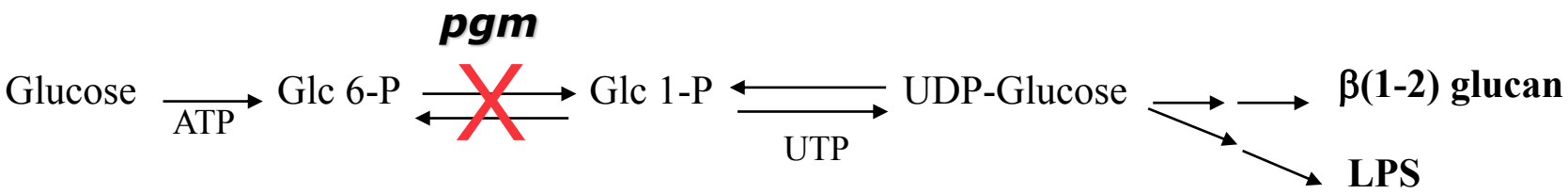
Ser estable, no revertir a formas virulentas

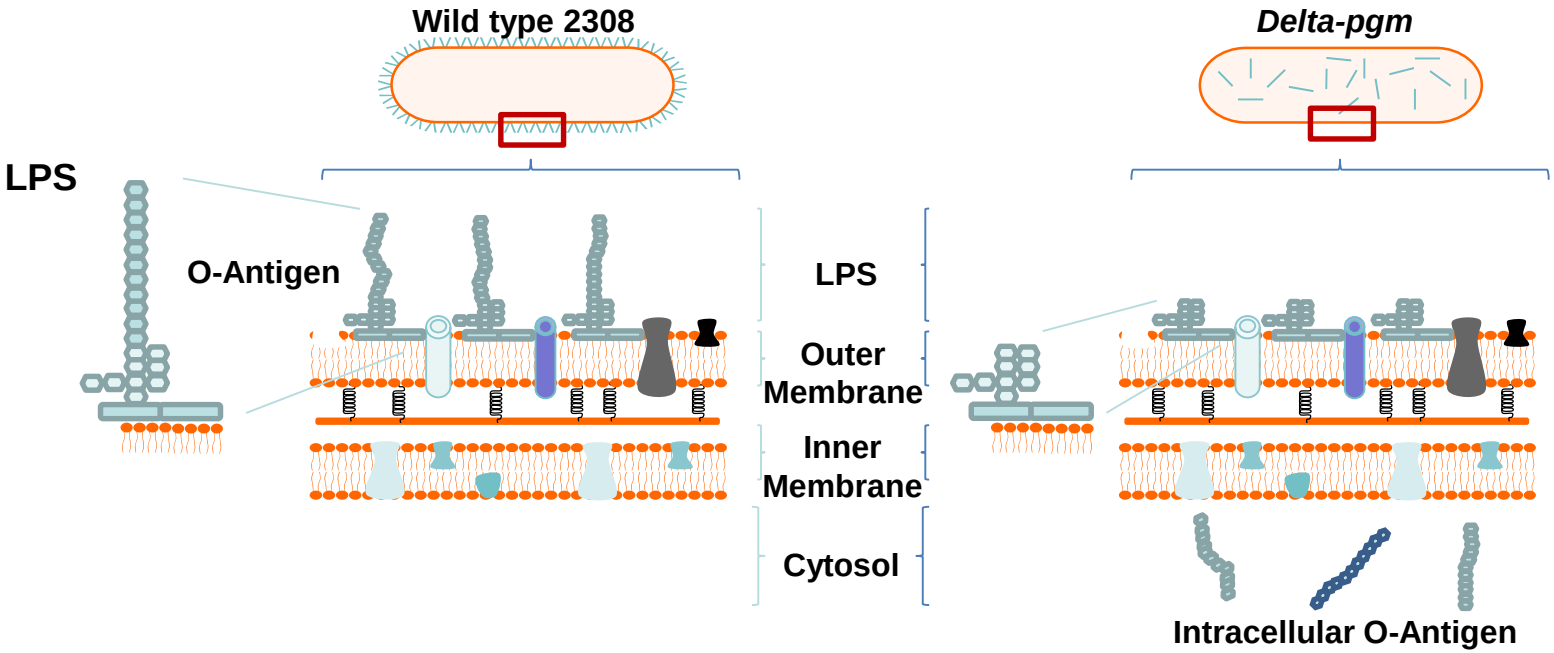
Ser sensible a antibióticos

Poder ser usada en mas de una dosis y en adultos.

Delta-pgm fue diseñada específicamente para cumplir estos criterios minimizando las desventajas de las vacunas ya existentes

La ausencia de fosfoglucomutasa hace que la vacuna *Delta-pgm* carezca del LPS en fase lisa y de los glucanos beta-cíclicos, dos factores de virulencia centrales para el patógeno





Delta-pgm- Un nuevo enfoque molecular para una mejor vacuna

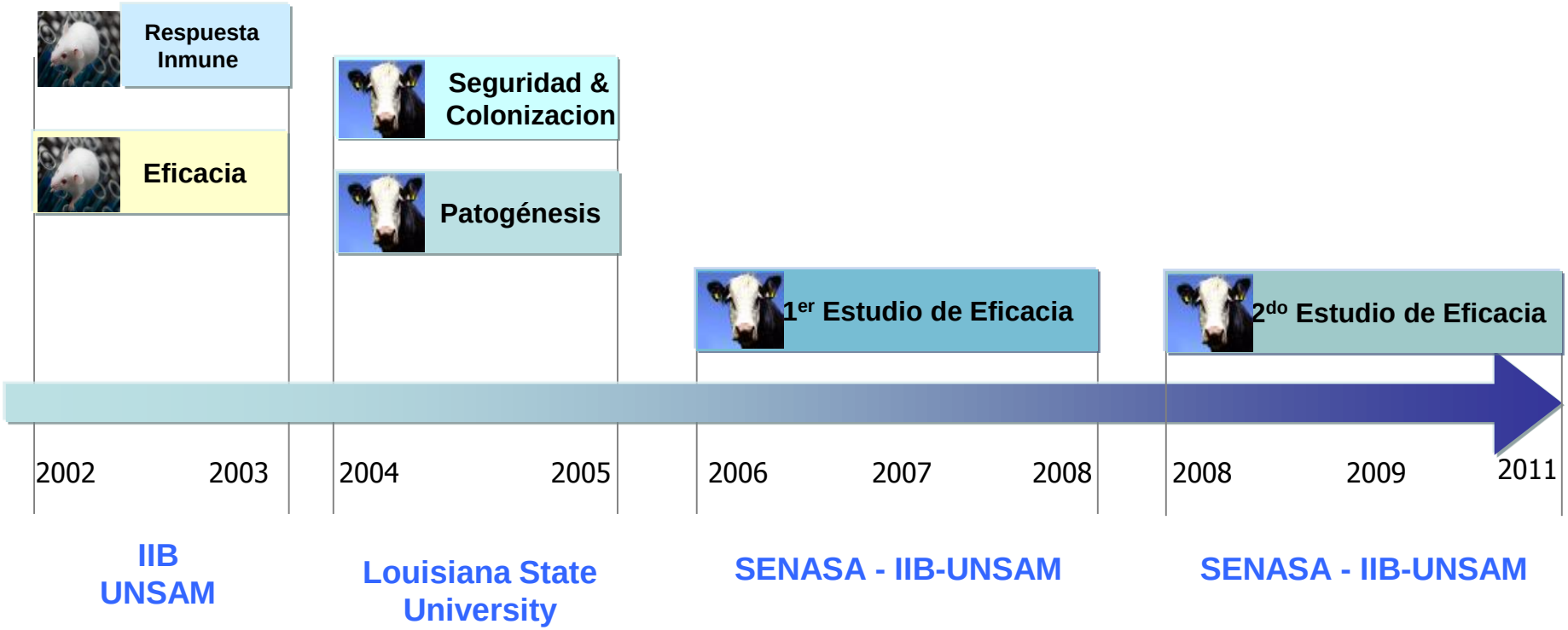
Después de 10 añós de desarrollo…

- **Los estudios genómicos, proteómicos y bioquímicos sobre *Brucella***
- **nos permitieron deletar uno de 3.962 genes**

Lo que resultó en …

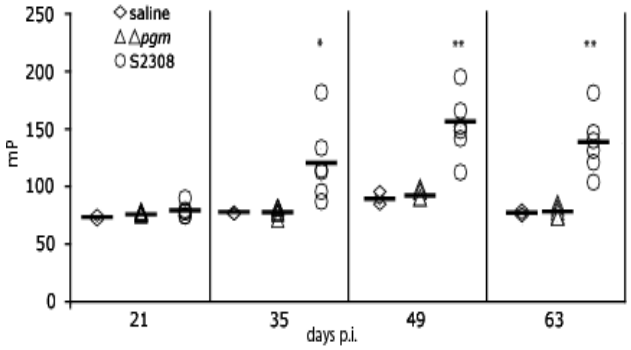
- **Una vacuna viva atenuada que no es virulenta para el bovino**
- **Confiere altos niveles de protección sin generar niveles persistentes de anticuerpos y aglutininas contra el LPS (O-PS)**
- **Estable, no revierte a la forma virulenta**
- **No porta resistencia contra antibióticos**
- **Puede ser administrada en mas de una dosis o como refuerzo de S19.**

Ensayos de Eficacia de *Delta-pgm* completados con éxito



Estudios en ratones:
Resumen

Ugalde, J.E. *et. al.* IAI, 2003. Ugalde, J.E. *et. al.* IAI, 2000. Comerci. D.J. *et. al.* IAEA, 2005.



Treatment Group	Mean log_{10} of brucellae in spleen at time post-challenge		Protection index at time post-challenge	
Days	**14**	**28**	**14**	**28**
Saline	5.35	4.73	-	-
Delta-pgm	3.10	2.80	2.25	1.93
S19	ND	2.95	ND	1.78

Resultados mas relevantes:

1. **Avirulenta en ratones aún a altas dosis, aunque es capaz de colonizar transitoriamente las células del hospedador**
2. **No induce títulos persistentes de anticuerpos anti-LPS**
3. **Induce respuesta inmune celular del tipo Th1 con altos títulos de Gamma interferon (el tipo de inmunidad efectiva para combatir la infección)**
4. **Vacunación con *Delta-pgm* indujo protección inmunológica contra el desafío con la cepa virulenta *B. abortus* 2308**

Seguridad: Estudios de Colonización en Bovinos

Lugar de Realización: **Dr. Phil Elzer, Louisiana State University, AgCenter, Baton Rouge, Louisiana, USA**

Período: **21/12/04 al 20/12/05**

Objetivo: **Determinación de Seguridad, Colonización de *Delta–pgm* en ganado**

Total de Animales: **8 hembras inoculadas con vacuna *Delta-pgm***

Resultados:

- **Signos patológicos de brucelosis ausentes**
- **La inoculación resulta en una colonización transitoria**
- **No hay interferencia con los test diagnósticos standard**

Seguridad: Estudios de Colonización en Bovinos

Brucella abortus 2308 vs. vacuna *Delta-pgm*

Ocho vacas fueron inoculadas en conjuntiva con $1x10^9$ UFC de la cepa *B. abortus Delta-pgm*.

A los 14, 21, 28, y 42 días post inoculación, dos animales fueron sacrificados.

Se analizaron nódulos linfáticos parótidos, nódulo prescapular, nódulo ilíaco interno, nódulo supramamario, hígado y bazo.

Los tejidos fueron analizados para determinar la presencia de la bacteria. Sólo se observó colonización transitoria en algunos órganos y no se observaron signos adversos o patológicos post inoculación.

Se tomaron muestras de suero previo a las necropsias.

Todas las muestras fueron negativas en RB dilución 1/2.

Los ensayos de Western blot revelaron la presencia de respuesta humoral detectable a partir de los 21 días post inoculación en dilución 1/10

Seguridad: Estudios de Colonización en Bovinos

B. abortus 2308 vs vacuna Delta-pgm

Animales inoculados con 1x10^9 UFC *B. abortus Δpgm* conjuntival

	Rosa Bengala		Western blot		Ganglios Primarios		Ganglios Secundarios		Órganos	
Dia	PreInfección	Necropsia	PreInfeccion	Necropsia	Parótido	Prescapular	Ilíaco Int.	Supramamario	Hígado	Bazo
14	neg	neg	neg	neg	1 UFC	-	-	-	-	-
21	neg	neg	neg	-/+	2UFC	1UFC	-	-	-	-
28	neg	neg	neg	+	-	-	-	-	1UFC	1UFC
42	neg	neg	neg	++	-	-	-	-	-	-

Animales inoculados con 1x10^9 UFC *B. abortus 2308* conjuntival

	Rosa Bengala		Western blot		Ganglios Primarios		Ganglios Secundarios		Órganos	
Dia	PreInfección	Necropsia	PreInfeccion	Necropsia	Parótido	Prescapular	Ilíaco Int.	Supramam.	Hígado	Bazo
14	neg	-/+	neg	-/+	300 UFC	130	-	-	-	-
21	neg	+	neg	+	200 UFC	80 UFC	-	-	10 UFC	25UFC
28	neg	++	neg	++	450 UFC	120 UFC	4 UFC	2 UFC	50 UFC	80UFC
42	neg	++	neg	++	150 UFC	40 UFC	3UFC	1 UFC	20 UFC	40UFC

Estudios de Patogenia en Bovinos

Lugar de Realización: **Dr. Phil Elzer, Louisiana State University, AgCenter, Baton Rouge, Louisiana, USA**

Período : 21/12/04 al 20/12/05

Objetivo: **Evaluar la patogenicidad potencial en bovinos preñados**

Total de Animales: **10 vacas preñadas inoculadas con *Delta-pgm***

Resultados:

- **Las hembras preñadas inoculadas con *Delta-pgm* llegaron a parición a término**
- **No se observaron signos de brucelosis ni en madres ni en terneros**
- ***Delta-pgm* no infectó ni estableció residencia**
- ***Delta-pgm* no interfirió con los test diagnósticos standard**

Estudios de Patogenia en Bovinos

Brucella abortus 2308 vs. vacuna *Delta-pgm*

Diez hembras preñadas fueron inoculadas en conjuntiva con $1x10^7$ UFC *B. abortus Delta-pgm* a los siete meses de gestación.

El ganado fue monitoreado para determinar aborto o parición.

Una vez ocurrido el parto o aborto, se tomaron muestras en necropsias de los terneros/fetos de: pulmones fetales, bazo y líquido abomasal.

Cuatro semanas post parto, las madres fueron sacrificadas y se tomaron muestras de: nódulos linfáticos parótidos, nódulo prescapular, nódulo ilíaco interno, nódulo supramamario, glándula mamaria, hígado y bazo.

Todas las muestras que fueron evaluadas para determinar la presencia de Brucella resultaron negativas.

Se tomaron muestras de suero al comienzo y final del estudio. Todas las muestras de suero resultaron negativas para RB dilución 1/2, lo que indica que *Delta-pgm* no interfiere con los diagnósticos serológicos.

Estudios de Patogenia en Bovinos

Brucella abortus 2308 vs. vacuna *Delta-pgm*

Dam Delivery Results	2308	*Delta-pgm*
Abortions	50%	0%
Weak Births	30%	10%
Healthy	20%	90%

	Current Results (100%)	
	2308	*Delta-pgm*
Fetus Tissues	+	-
Dam Tissues	+	-

Dam Sera Results		
	2308	*Delta-pgm*
Seropositive	+	-

Estudios de Patogenia en Bovinos

Brucella abortus 2308 vs. vacuna *Delta-pgm*

Resumen

Los resultados indican que la vacuna ***Delta-pgm*** es capaz de colonizar transitoriamente a los bovinos **sin generar una infección persistente** ni la inducción de anticuerpos aglutinantes que interfieran con los test diagnósticos standard.

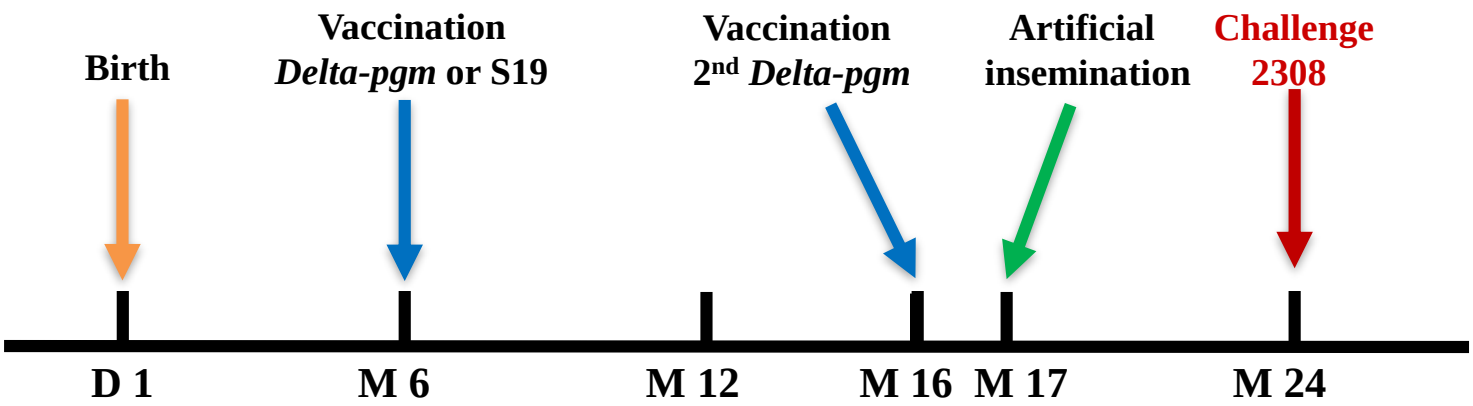
Se la debe considerar **segura** para el uso dado que no causa efectos adversos tanto en bovinos preñados como no-preñados.

No se aislaron bacterias tanto en las madres como en las terneras, lo que indica que **el organismo no es infectivo** o capaz de establecer residencia en el tracto reproductivo.

Estudios de Eficacia en Bovinos

Estudios de Eficacia en Bovinos

PRIMER ESTUDIO

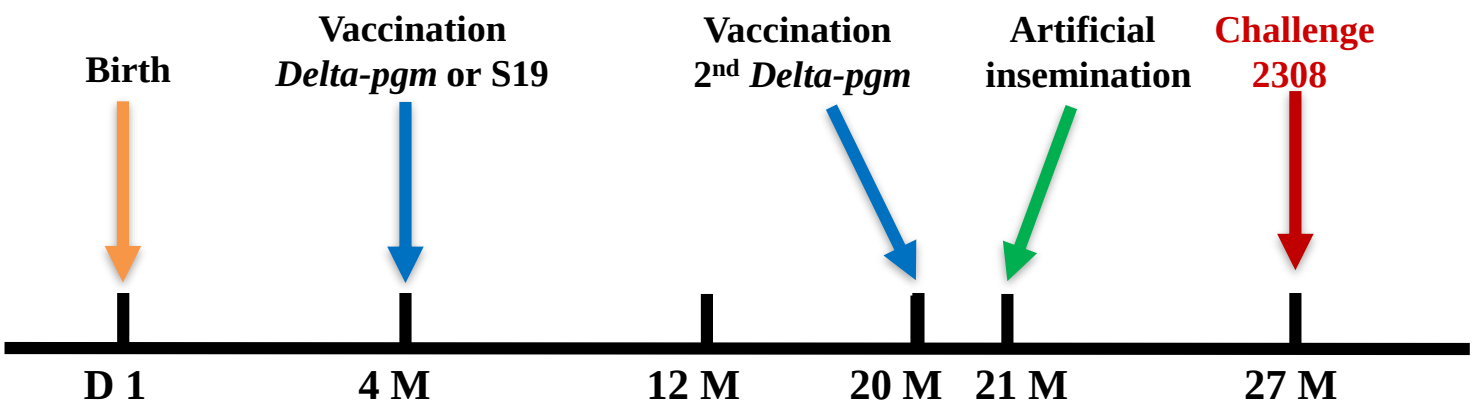


60 hembras cruza Angus x Hereford - 4 Grupos de 15 animales (No-vacunado, 1 dosis *Delta-pgm*, S19, and 2 dosis *Delta-pgm*).
Se analizó serología sobre todo el grupo y sólo 31 animales fueron desafiados.

Vacunación subcutánea con 1-3x10^{10} UFC de *Delta-pgm* y desafío intramuscular con 1x10^{7} CFU de *B. abortus* 2308

Estudios de Eficacia en Bovinos

SEGUNDO ESTUDIO



45 hembras británicas x índicas x criollo - 3 Grupos de 15 animales (No-vacunados, 2 dosis *Delta-pgm* y S19).
Se analizó serología sobre todo el grupo y sólo 31 animales fueron desafiados

Vacunación subcutánea con 1-3x10^{10} UFC de *Delta-pgm* y desafío intramuscular con 3x10^{7} CFU de *B. abortus* 2308

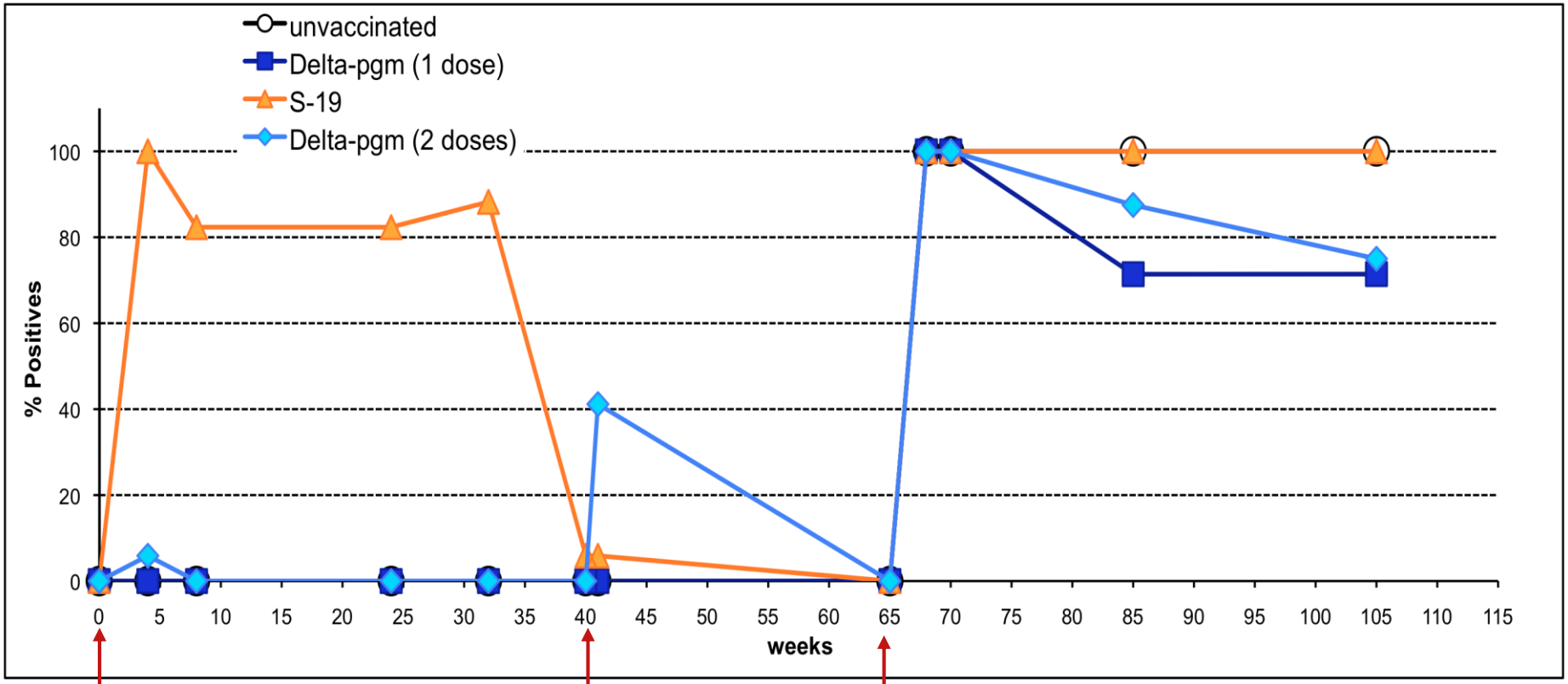
Estudios de Eficacia en Bovinos

Se evaluó:

- **Serología (BPA y FPA y en algunos casos SAT, 2-ME, y Elisa)**
- **Hemocultivo en vaquillonas a tres tiempos p.i.**
- **Tiempo de gestación**
- **Estatus del ternero al momento del parto y bacteriología**
- **Excreción en leche**
- **Colonización de las vaquillonas post-parto**

Estudios de Eficacia en Bovinos

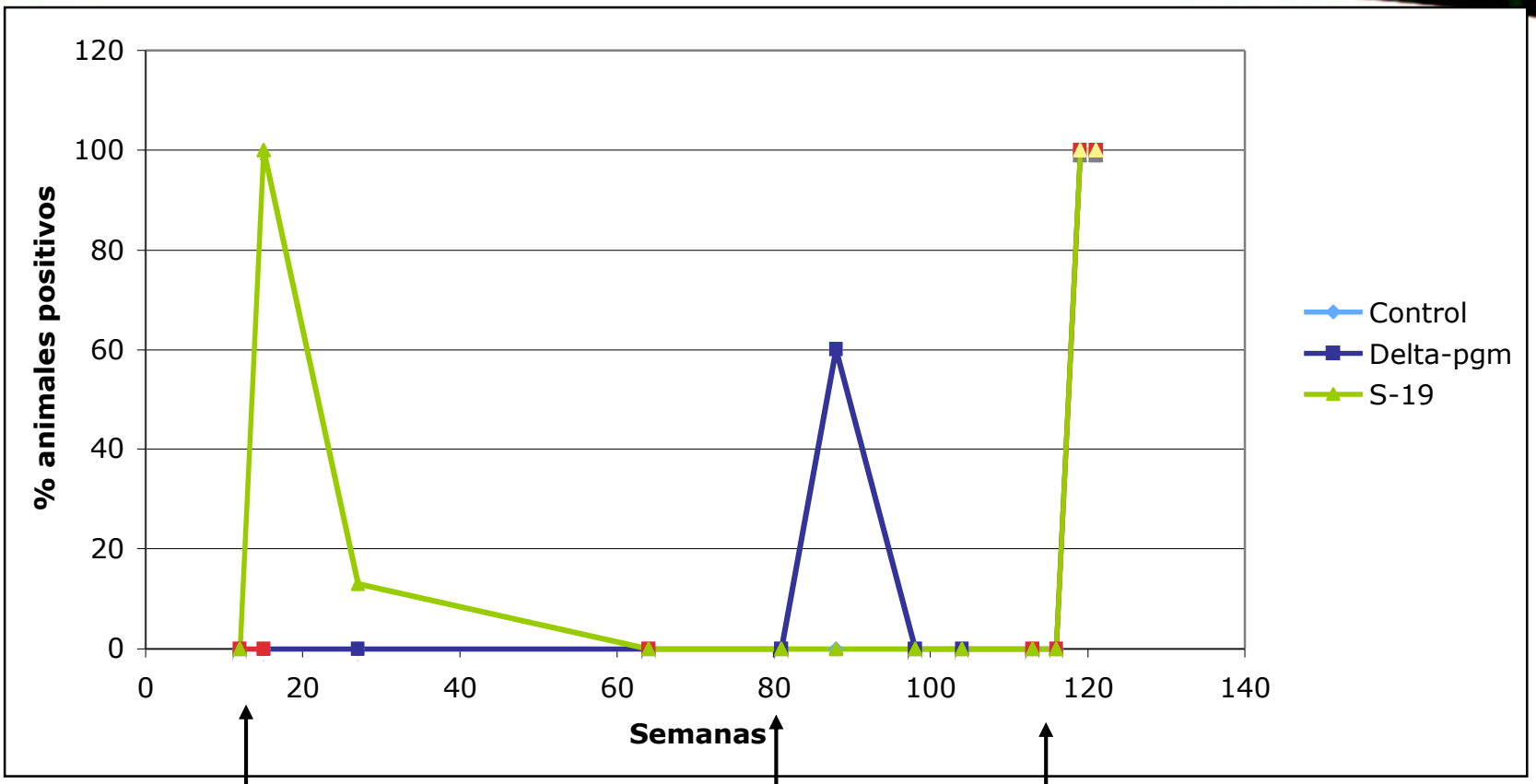
1er Estudio de Eficacia en Bovinos: Serología



1ra dosis **2da dosis** **Desafío**

Se considera animal positivo cuando BPA es positivo y al menos SAT, ELISa y/o FPA son positivos

2do Estudio de Eficacia en Bovinos: Serología



Vacunación
14/11/2008

Re-vacunación
18/03/2010

Desafío
2/10/2010

Se considera animal positivo cuando BPA es positivo y al menos SAT, ELISa y/o FPA son positivos

Estudio de Eficacia en Bovinos: Serología - Conclusiones

- ***Delta-pgm*** **no induce anticuerpos ni aglutininas anti-LPS persistentes**

- ***Delta-pgm*** **administrada en dos dosis sólo induce anticuerpos anti-LPS transitorios en el 40-60 % de los animales inoculados. Estos títulos desaparecen a los 6 meses de aplicación de la segunda dosis.**

- **Aún administrada en dos dosis,** ***Delta-pgm*** **no genera títulos detectables en la prueba FPA**

Delta-pgm **no interfiere con los test serológicos estandar**

Estudio de Eficacia en Bovinos: Pariciones

Primera Prueba

Grupos (n)	Muerte Perinatal (%)	Sanos (%)	Tiempo de Gestación Media
Control (7)	71.5	28.6	239 ± 22.6
Delta-pgm X1(7)	14.3	85.7	268 ± 16.1
Delta-pgm X2 (8)	**12,5**	**87,5**	**275.5 ± 13.8**
S-19 (9)	33,3	66,7	269 ± 15

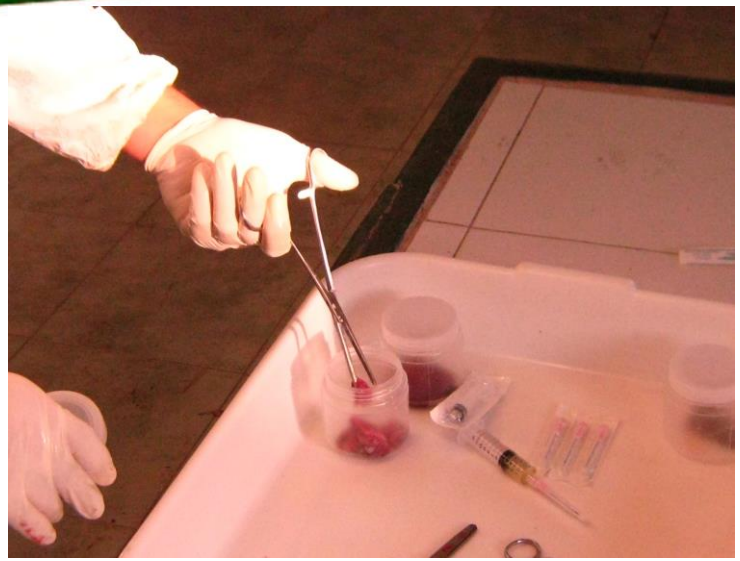
Segunda Prueba

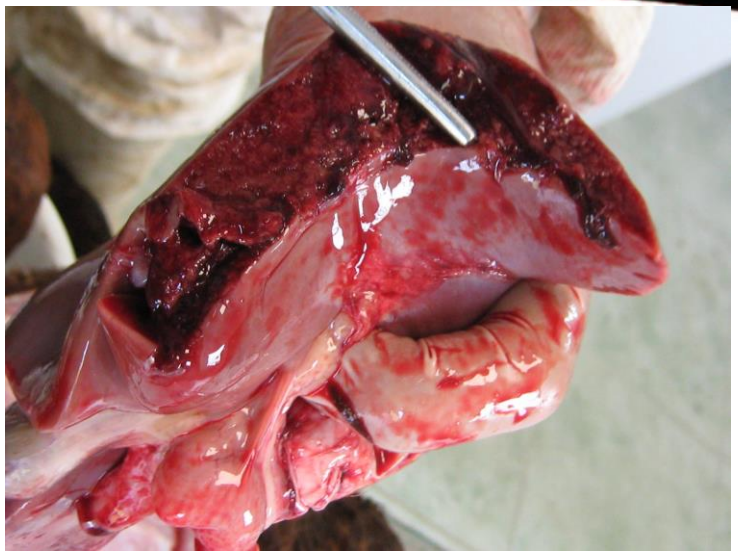
Grupos (n)	Muerte Perinatal (%)	Sanos (%)	Tiempo de Gestación Media
Control (10)	100	0	235.5 ± 9.9
Delta-pgm X2 (11)	**45.5**	**54.5**	**250 ± 25.4**
S-19 (10)	70	30	249.5 ± 21.5

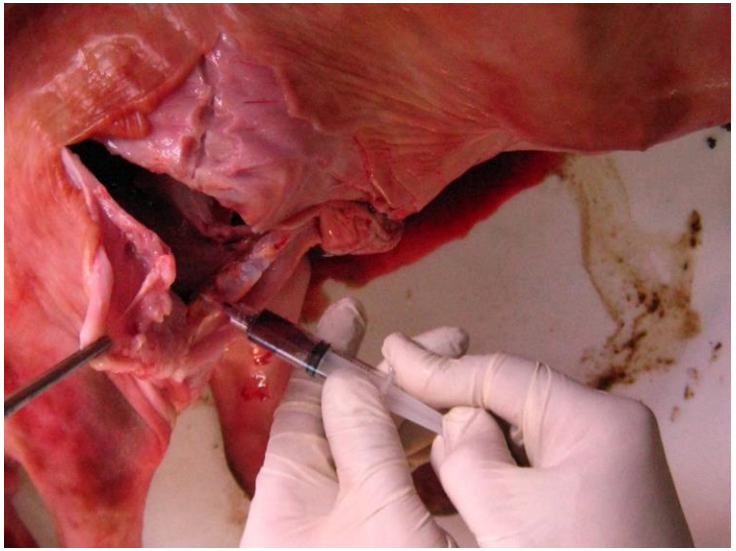
Muerte perinatal= Mortinatos + Muerte neonatal temprana (7d) + Muerte neonatal tardía (28d)

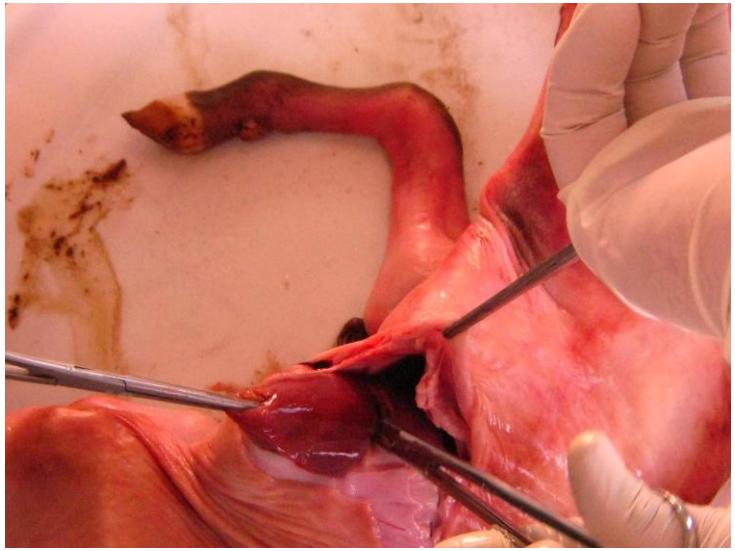
Estudio de Eficacia en Bovinos: Pariciones

Estudio de Eficacia en Bovinos: Bacteriología









Estudio de Eficacia en Bovinos: Bacteriología

Primera Prueba

	Bazo #muestras positivas /Totales	**Hígado** #muestras positivas /Totales	**Pulmón** #muestras positivas /Totales	**Abomaso** #muestras positivas /Totales	**#muestras positivas /Totales (%)**
Control	**3/3**	**2/3**	**3/3**	**2/3**	**10/12 (84%)**
Delta pgm X1	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/1**	**3/4 (75)**
S-19	**3/3**	**2/3**	**3/3**	**1/3**	**9/12 (75)**
Delta pgm X2	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/1**	**3/4 (75)**

Segunda Prueba

Grupos	**Bazo** #muestras posit/Total	**Hígado** #muestras posit/Total	**Pulmón** #muestras posit/Total	**Abomaso** #muestras posit/Total	**#muestras posit/Total (%)**
Control	**6/10**	**3/10**	**7/10**	**5/9** 55,6%	**21/39 (53,8)**
Delta-pgm X2	**3/6**	**2/6**	**2/6**	**1/5** 20%	**8/23 (34,8)**
S-19	**5/8**	**5/8**	**6/8**	**5/6** 83.3%	**21/30 70%**

Estudio de Eficacia en Bovinos: Pariciones - Conclusiones

- **Los animales no vacunados presentaron entre el 71 al 100% de muertes perinatales causadas por Brucella, indicando que el desafio con cepa virulenta fue efectivo.**

- **Los animales vacunados con *Delta-pgm* presentaron mayor tiempo de gestación media en ambos ensayos, igual o superior a la del grupo S19.**

- **Los animales vacunados con *Delta-pgm* presentaron menor porcentaje de muertes perinatales y mayor porcentaje de pariciones viables a término en ambos ensayos**

***Delta-pgm* confiere elevada protección contra el aborto brucélico**

Estudio de Eficacia en Bovinos: Liberación en Leche

	% de Animales Positivos		UFC / ml Acumuladas	
Grupos	**1ra Prueba**	**2da Prueba**	**1ra Prueba**	**2da Prueba**
Control	100%	100%	> 1,000	> 68,000
S19	44.5%	44%	≤ 300	≤ 20,000
***Delta-pgm* X2**	62.5%	44%	≤ 90	≤ 3,900

Cultivo directo y cultivo bifásico Ruiz-Castañeda enriquecido.

Se consideró Animal Positivo si al menos una colonia fue aislada de alguno de los cuatro cuartos muestreados.

UFCs Acumuladas corresponde al numero de UFC totales aisladas en todo el grupo.

Estudio de Eficacia en Bovinos: Liberación en Leche

- **Todos los animales no vacunados excretaron en leche un número elevado de *Brucella.***

- **Entre el 40 y 60% de los animales vacunados con *Delta-pgm* excretaron la bacteria en forma intermitente**

- **El grupo de animales vacunados con *Delta-pgm* fue el que excretó el menor número de bacterias virulentas en leche.**

***Delta-pgm* reduce significativamente la excreción de Brucella en leche**

Estudio de Eficacia en Bovinos: Colonización vaquillonas

Primera Prueba

Grupos	Ganglios Supramamarios (# de animales)		
	Muestras Positivas	Muestras Negativas	TOTAL (% positivas)
Control	4	3	7 (57)
Delta-pgm X1	5	2	7 (71.4)
S-19	4	4	8 (50)
Delta-pgm X2	2	6	8 (25)

Segunda Prueba

Grupos	Supramamario #muestras posit/Total	Iliaco #muestras posit/Total	Prescapular #muestras posit/Total	Precrural #muestras posit/Total	#muestras posit/Total
Control	**8/9** 88,89%	**5/9** 55,56%	**6/10** 60%	**7/9** 77,78%	**26/37** **70,27%**
Delta-pgm X2	**5/11** 45,45%	**0/8** 0%	**1/9** 11,1%	**2/8** 25%	**8/36** **22,22%**
S-19	**3/9** 33,34%	**0/8** 0%	**3/9** 33,34%	**2/8** 25%	**8/34** **23,52%**

Estudio de Eficacia en Bovinos: Colonización de vaquillonas

- **Todos los animales no vacunados fueron colonizados por *Brucella* contra el 70% de los animales del grupo S19 y solo el 45% de los vacunados con *Delta-pgm* presentaron alguna muestra positiva.**

- **Tanto el grupo vacunado con S19 como el vacunado con *Delta-pgm* presentaron los menores índices de colonización**

Delta-pgm* previene la colonización por *Brucella

Conclusiones Generales

- ***Delta-pgm*** ***es avirulenta en los modelos animales testeados (murinos y bovinos)***

- ***Delta-pgm*** **es incapaz de infectar y establecer residencia en el tracto reproductivo bovino**

- ***Delta-pgm*** ***no genera abortos ni pariciones prematuras***

- ***Delta-pgm*** **no coloniza los tejidos fetales y no se excreta en leche**

Conclusiones Generales

- ***Delta-pgm*** **no induce producción de anticuerpos aglutinantes persistentes que interfieran con los test serológicos de uso corriente para el diagnóstico de la enfermedad en los rodeos**

- **El uso de *Delta-pgm* en un régimen de dos dosis, una a los 6 meses de edad y otra aplicada 15-20 días pre-servicio, confiere protección contra la infección por cepas virulentas de *B. abortus*, reduciendo el riesgo de abortos, partos prematuros, colonización de tejidos maternos y fetales y excreción de brucellas virulentas en leche.**

Conclusiones Generales

- ***Delta-pgm*** **es estable e incapaz de revertir a la forma lisa virulenta.**

- ***Delta-pgm*** **cumple con los requerimientos del mercado internacional de una vacuna rugosa que no interfiera el diagnóstico cuando se aplica en adultos, con el agregado de que en este caso, confiere una sólida inmunidad al menos equivalente a la que produce la Cepa 19.**

Delta-pgm **es una vacuna segura y eficaz para aplicar anualmente en animales juveniles y adultos con el fin de elevar el estatus inmunitario de los rodeos bovinos**

Ventajas Comparativas de Delta-pgm

Delta-pgm supera a S-19 en:

- **No interfiere con los test serológicos**
- **Puede ser aplicada tanto en terneras como en vaquillonas en mas de una dosis porque no genera títulos anti-LPS persistentes**
- **No es abortigénica**

Delta-pgm supera a RB51 en:

- **Es sensible a todos los antibióticos necesarios para el tratamiento de la brucelosis**
- **Es genéticamente definida**
- **Capacidad protectiva superior tanto en modelo murino como bovino**

Dr. Diego J. Comerci Dr. Juan E. Ugalde

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

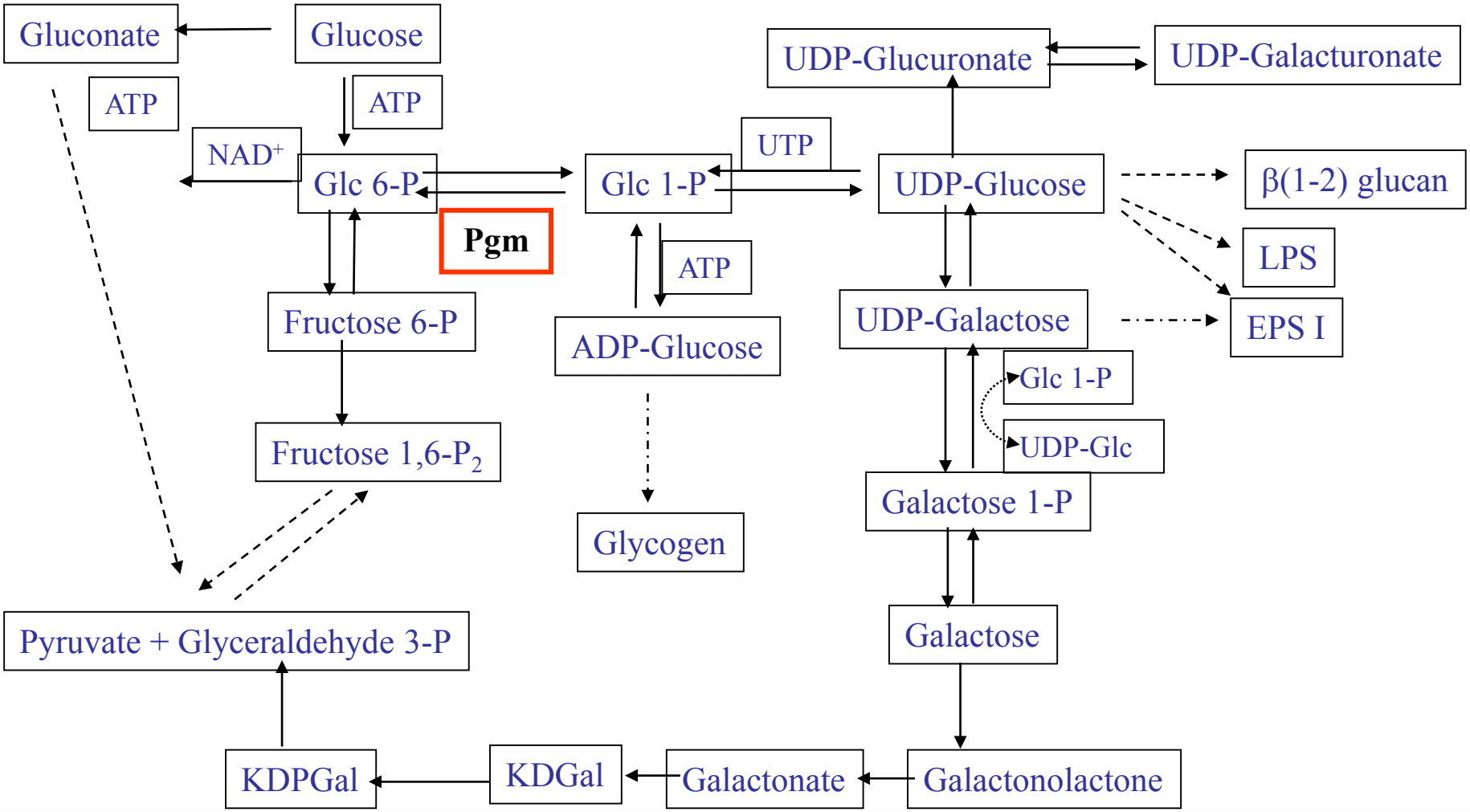
IIB-INTECH-UNSAM-CONICET

ARGENTINA

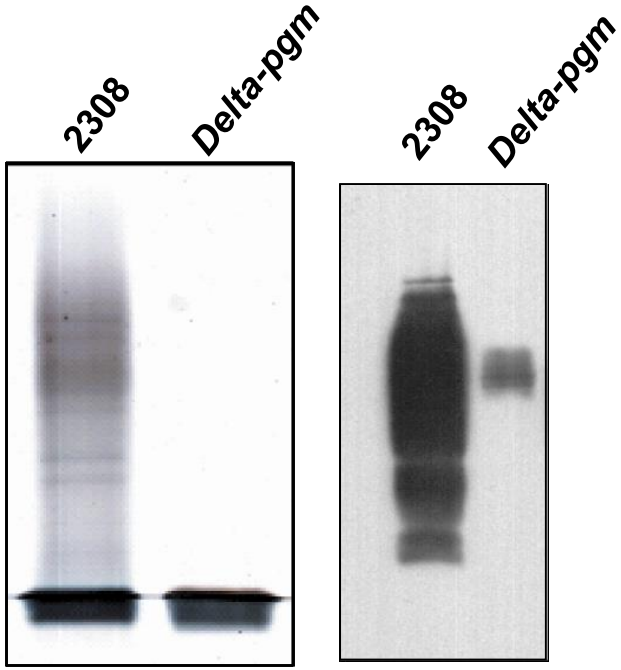
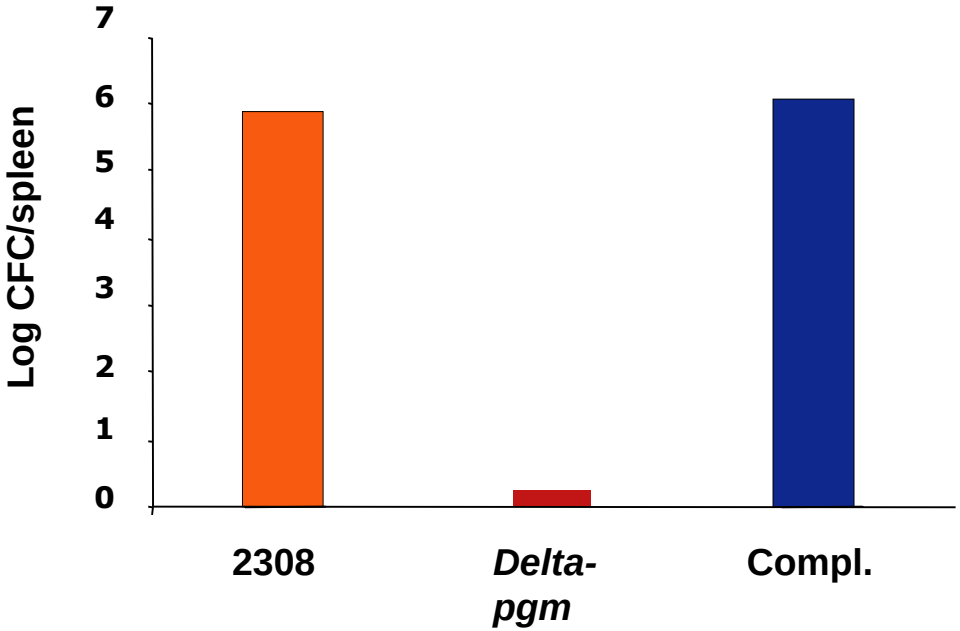
Desarrollo de la vacuna Delta-pgm

El rol clave del Metabolismo de Azúcares

La vacuna *Delta-pgm* fue desarrollada mediante la deleción limpia del gen que codifica la fosfoglucomutasa, enzima clave en el metabolismo de azúcares en Alpha-2 Proteobacteria



Desarrollo de la vacuna Delta-pgm

El rol clave del Metabolismo de Azúcares

La ausencia de fosfoglucomutasa hace que la vacuna *Delta-pgm* carezca del LPS en fase lisa y de los glucanos beta-cíclicos, dos factores de virulencia centrales para el patógeno