

18. CARACTERIZACION DE CANDIDATOS VACUNALES DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Tomazic M.L.^{1,2}, Lombardelli J.^{2,3}, Poklepovich T.¹, Rodríguez A.E.¹, Galarza R¹., Toledo J.^{1,4}, Garro C.¹, Tiranti K.³, Florin-Christensen M.^{1,2,4} Schnittger L.^{1,2,4}

¹Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuaria (INTA),

²Consejo Nacional de Investigaciones y Científicas y Tecnológicas (CONICET)

³Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto

⁴Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón

Autor de correspondencia: schnittger.leonhard@inta.gov.ar

INTRODUCCION: La criptosporidiosis bovina es causada por el protozoo apicomplexa *Cryptosporidium* spp. y es una enfermedad desatendida a nivel global y local. Es una zoonosis y antroposis que afecta a inmunosuprimidos y a niños menores de 3 años. A nivel local, se considera a los terneros como mayor reservorio para el parásito y por ende para su diseminación, ya que es el ooquiste, eliminado por las heces, el causante de las infecciones. Hasta hoy, estudios moleculares han identificado en terneros exclusivamente a la especie *C. parvum* en nuestro país, la cual es considerada la especie zoonótica mas importante. En la actualidad solo existen medidas paliativas, no hay drogas ni vacunas que curen ni controlen la enfermedad.

El desarrollo de una vacuna efectiva traería aparejados múltiples beneficios, no solo porque mejoraría la salud y el bienestar de los animales sino que permitiría controlar la zoonosis y los brotes causados por contaminación de aguas y alimentos con ooquistes, mejorando así la salud pública. La búsqueda de antígenos capaces de generar anticuerpos protectivos es esencial para el desarrollo de formulaciones vacunales. Los protozoos parásitos tienen abundantes proteínas asociadas a la superficie celular a través de un complejo glicolipídico denominado glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cuales están implicadas en el proceso de invasión. A partir de un estudio previo del proteoma de *C. parvum* con herramientas bioinformáticas, se identificó una lista de potenciales candidatos vacunales predichos de ser anclados por GPI. El objetivo de este trabajo se centra en la verificación de la conservación de tres de estos antígenos y su capacidad de ser reconocidos por la respuesta humoral de terneros infectados con *C. parvum*.

MATERIAL Y METODOS: Para una análisis más detallado de los antígenos se usaron las siguientes herramientas bioinformáticas: (i) base de datos CryptoDB (para determinar su expresión en los estadios infectivos), (ii) Blast reverse y OrthoMCL (para la búsqueda de ortólogos), (iii) Interpro y Pfam (para la identificación de dominios funcionales) y (iv) BCPRED y BEPIPRED, Kolaskar (para la predicción de epitopes B). El polimorfismo del antígeno CpH-1 se determinó por amplificación por PCR seguido de secuenciación a partir de ADNg de 5 aislamientos de terneros naturalmente infectados. Los mismos provienen de tambos ubicados en las localidades de Santa Fe (subgenotipo: *IlaA20G1R1*), Córdoba (subgenotipo: *IlaA21G1R1*, *IlaA23G1R1*) y Buenos Aires (subgenotipos: *IlaA17G1R1*). Se expresó el marco abierto de lectura de los genes amplificado a partir de aislamientos del subgenotipo *IlaA23G1R1* de *C. parvum* encontrado hasta el presente exclusivamente en Argentina y fueron clonados en el vector pRSET con un tag de histidina. Se utilizó una cepa expresión de *E. coli* (Rosetta 2DE3 pLacI). Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) y fueron utilizadas para ensayos de Western-Blot (WB).

A partir de 10 terneros se tomaron 23 sueros en al menos dos etapas de su vida: una primera vez entre el día 1 y 10 y una segunda vez entre el día 15 y 28 de edad. En dos casos se

tomaron también sueros en el día 38 y en un solo caso en el día 52 de edad. Todos los sueros usados provinieron de terneros previamente diagnosticados como positivos a *Cryptosporidium* por microscopía óptica. Además, se determinó también a *C. parvum* como especie infectante por PCR-RFLP. De 6 terneros se determinó también por refractometría si había falla de la transferencia pasiva de la inmunidad (FTPI).

RESULTADOS Y DISCUSION: Los tres antígenos seleccionados se denominaron: (i) CpH1, (ii) CpSubL y (iii) CpGP60. Estos antígenos no presentan ortólogos en otros organismos, uno de estos, CpSubL, presenta un dominio funcional conservado que podría participar en el proceso de invasión. Los tres antígenos presentan epitopes B y se expresan en el estadio de infección. El análisis de polimorfismo del antígeno CpH1 mostró 100% de identidad entre los aislamientos, y en consecuencia los epitopes B predichos también son conservados. El gen que codifica para CpGP60 es un gen polimórfico, contiene una región hipervariable la cual es utilizada para determinar el subgenotipo de *C. parvum*. Los epitopes B de esta proteína mostraron identidad entre los 5 aislamientos geográficos, a excepción de la región hipervariable, la cual coincide con un epitope B.

Para evaluar si las proteínas recombinantes en estudio son reconocidas por sueros de terneros naturalmente infectados, se realizó un análisis por WB. Se pudo verificar que solo 5 de los 10 terneros reconocieron la proteína CpGP60 en la primera fase (1-11 días) de toma de sueros mientras 9 sueros mostraron inmunoreactividad en la segunda fase (15-28 días). Este resultado sugiere que una prolongada infección aumenta considerablemente el número de individuos que muestran seroconversión. Para el antígeno CpH1, sueros de 5 de los 10 terneros mostraron reacción en la primera fase (1-11 días) y 6 mostraron reactividad en la segunda fase (15-28 días) de toma de sueros. Para este antígeno se puede asumir que con un prolongado tiempo de infección no se aumenta significativamente la seroconversión. Al contrario, el antígeno CpSubL mostró inmunoreactividad en las dos fases de toma de muestras (1-11 días y 15-28 días) para todos los 10 terneros fuertemente sugiriendo que es un antígeno altamente inmunodominante.

Es de interés que entre terneros sin y con FTPI no hubo diferencias en la inmunoreactividad con ninguno de los tres antígenos. Esta observación podría indicar que anticuerpos específicos contra estos antígenos no están presentes y/o no son transferidos con el calostro. En futuros estudios se plantea de investigar esta hipótesis con más profundidad. En particular el antígeno CpSubL pero también GP60 muestran una alta tasa de seroconversión en los 10 terneros. Esta característica, como también la presencia de epitopes B conservados, hace que estas proteínas sean atractivos candidatos vacunales.

Financiamiento: FonCyt: PICT-2013-1708; INTA: PNBIO-1131034 y PNSA-1115053; Fundación Universidad de Morón PID8-2015.