

**I SIMPOSIO INTERNACIONAL
X JORNADAS Y REUNION ANUAL DE LA
ASOCIACIÓN ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA
VETERINARIA**

AAIV 2017

*“Diez años reuniendo
especialistas,
investigadores y
docentes que trabajan en
Inmunología Veterinaria”*

**8, 9 y 10 de Noviembre
FVET - UBA
Buenos Aires**

**I Simposio Internacional y
X Jornadas y Reunión Anual
de la Asociación Argentina de
Inmunología Veterinaria (AAIV)
2017**

RESÚMENES

Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria (AAIV)

Los objetivos de la AAIV son:

- Promover el desarrollo académico, científico y tecnológico de la Inmunología Veterinaria en el país.
- Promover las actividades de Docencia e Investigación en cada una de las Entidades que participan en la Sociedad y la difusión de estas actividades.
- Promover la vinculación entre cada una de las Entidades que participan en la Sociedad y la vinculación tecnológica de éstas con el Medio y con las Empresas.

Dentro de este marco hemos realizado desde el año 2008 Jornadas en las que se discuten trabajos científicos de la especialidad, se presentan resultados de técnicas inmunológicas y oferta de servicios diagnósticos y se debate sobre la problemática educativa de la Inmunología Veterinaria en las Universidades del país. El Consejo Directivo está constituido por representantes de Instituciones vinculadas a la docencia universitaria, a organismos gubernamentales y a Institutos de Investigación y Extensión. Les damos la bienvenida a estas Jornadas, esperando que disfruten de este gran intercambio de conocimientos e ideas sobre la Inmunología Veterinaria.

Reuniones Fundacionales

- Colegio de Veterinarios, Rosario, Santa Fe, 23 de mayo 2007
- Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, 3 de agosto 2007
- Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, 2 de noviembre 2007

Jornadas Científicas Anteriores

- Primeras Jornadas y Reunión Anual. 21 de noviembre de 2008, Ciudad de Buenos Aires (Sede: Sociedad de Medicina Veterinaria).
- Segundas Jornadas y Reunión Anual. 10 y 11 de diciembre de 2009, Rosario – Santa Fe (Sede del Colegio de Médicos Veterinarios de la Provincia de Santa Fe - 2ª Circunscripción).
- Terceras Jornadas y Reunión Anual. 1 y 2 de noviembre de 2010, Buenos Aires (Sede: Sociedad de Medicina Veterinaria).
- Cuartas Jornadas y Reunión Anual. 1 y 2 de diciembre de 2011, Río Cuarto - Córdoba (Sede: Universidad Nacional de Río Cuarto).
- Quintas Jornadas y Reunión Anual. 18 y 19 de octubre de 2012, Esperanza - Santa Fe (Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL).
- Sextas Jornadas y Reunión Anual. 28 y 29 de noviembre de 2013, Casilda - Santa Fe (Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR).
- Séptimas Jornadas y Reunión Anual. 2 y 3 de diciembre de 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. (Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA)
- Octavas Jornadas y Reunión Anual. 2 y 3 de noviembre de 2015. Tandil - Buenos Aires (Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNICEN).
- Novenas Jornadas y Reunión Anual. 11 de noviembre de 2016, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. (Sede: Sociedad de Medicina Veterinaria).

I Simposio Internacional y X Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria AAIV 2017

8-10 de noviembre de 2017

Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad de Buenos Aires
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina

COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTE

Silvia L. Mundo (UBA)

VICE-PRESIDENTES

Mirta Arestegui (VIC)

Cecilia Greco (AAIV)

SECRETARÍA GENERAL

Ana Jar (UBA)

Eduardo Mórtola (UNLP)

SECRETARÍA CIENTÍFICA

Mirta Arestegui (VIC)

Lidia Gogorza (UNCPBA, UNRN)

Cecilia Greco (AAIV)

Carina Porporatto (UNVM)

SECRETARÍA TÉCNICA

Alejandra Capozzo (CONICET)

Mónica Fernández (Boehringer- Ingelheim)

Carolina Velez (UNLPam)

SECRETARÍA DE FINANZAS

Bárbara Fernández (UBA)

Adriana Soutullo (Ministerio de la Pcia. de Santa Fe)

COMITÉ LOCAL

Sofía Gala Barrientos

Sebastián Burrello

Viviana Chevaga

Silvia Colavecchia

Susana Fernández

Ana Jolly

Comisión Directiva de la AAIV Periodo 2016-2017

PRESIDENTE

Lidia Gogorza (UNCPBA, UNRN)

VICE-PRESIDENTE

Ana Jar (UBA)

SECRETARIA

Alejandra Capozzo (CONICET, INTA Castelar)

PRO-SECRETARIA

Adriana Soutullo (Ministerio de la Producción, Pcia. de Santa Fe)

TESORERA

Silvia Colavecchia (UBA)

PRO-TESORERA

Celina Buscaglia (CIC)

SECRETARIA DE ACTAS

Carina Porporatto (UNVM)

VOCALES TITULARES

Eduardo Mórtola (UNLP)

Carolina Vélez (UNLPam)

Estela Vera (UNL)

Olga Sánchez Negrette (UCASal)

VOCALES SUPLENTE

Cecilia Greco (AAIV)

Mónica Fernández (Boehringer- Ingelheim Argentina)

Patricia Zamorano (INTA Castelar)

Onelia Lavaroni (UNL)

El Comité Organizador del 1° Simposio Internacional y X Jornadas de la Asociación Argentina de inmunología Veterinaria agradece la colaboración de los siguientes profesionales.

Tribunal de Evaluación de Trabajos para Premio

Dr. Luis Fernando Calvino

Dra. Silvia Hajos

Evaluadores de Resúmenes

Mirta Arestegui	José Gutiérrez Pabello	Carina Porporatto
Celina Baraballe	Cecilia Greco	Valeria Quattrocchi
María Laura Breser	Ana Jar	Andrea Racca
Luciana Bohl	Cecilia Langelotti	María Sol Renna
Laura Noelia Cariddi	Alejandra Larsen	Olga Sanchez Negrette
Bibiana Dallard	Ana Paola Miceli	Myriam Trotta
Silvia Estein	Graciela Miceli	Carolina Veaute
María Belén Forlenza	María Cruz Miraglia	Estela Vera
Lidia Gogorza	Eduardo Mórtola	Patricia Zamorano
	Matías Pellegrino	

Moderadores de Mesas Redondas

Guadalupe Álvarez

Mirta Arestegui

Elvira Falzoni

Lidia Gogorza

Fabiana Grinsztajn

Ana Jolly

Alejandra Larsen

Fernando Paolicchi

Moderadores de Sesiones de Pósters

Soledad Barandiarán

Silvia Colavecchia

Lucas Goldman

Pablo Jaworski

Ana Jolly

Onelia Lavaroni

Olga Sanchez Negrette

Ricardo Sarmiento

Estela Vera

Patricia Zamorano

Graciela Miceli

Magdalena Rambeaud

Andrea Dellarupe

Buenos Aires, noviembre de 2017.

El Comité Organizador del 1° Simposio Internacional y X Jornadas de la Asociación Argentina de inmunología Veterinaria agradecen a aquellas personas, Instituciones y Empresas que han brindado apoyo a su realización.

AUSPICIANTES



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

PATROCINANTES



PROGRAMA

MIÉRCOLES 8/11**09.00 a 09.30: ACREDITACIONES****09.30 a 10.00: CEREMONIA DE APERTURA DEL SIMPOSIO:
PALABRAS DE BIENVENIDA**

Prof. Marcelo Miguez, Decano de la Facultad de Cs. Veterinarias, UBA
 Dra. Mabel Basualdo Presidenta de SOMEVE
 Dr. Florestán Maliandi, Presidente SOMEVE saliente
 Dra. Silvia Mundo, Presidenta del Simposio.

**10.00 a 11.00: CONFERENCIA INAUGURAL:
VACCINES AS DISEASE CONTROL STRATEGIES.**

(Vacunas como estrategias de control de las enfermedades).

Gary Entrican, PhD. (Principal Research Scientist, Moredun Research Institute and Honorary Professor, College of Medicine and Veterinary Medicine, University of Edinburgh. Edinburgh, Scotland, UK.)

**11.30 a 12.15: CONFERENCIA:
RECOMENDACIONES DE LA COMISIÓN LATINOAMERICANA DE VACUNAS EN ANIMALES DE COMPAÑÍA
(COLAVAC).**

Dra. Nélide Gómez (FCV-UBA, C.A.B.A.).

**12.15 a 13.00: CONFERENCIA:
VACUNAS RECOMBINANTES EN PEQUEÑOS ANIMALES. VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS**

Dra. Cecilia Figueroa (Boehringer- Ingelheim)

**14.30 a 16.00: MESA REDONDA:
ACTUALIZACIONES EN INMUNOPROFILAXIS**

Nuevas tecnologías en vacunas aviarias.

Dr. Angel Menendez (Boehringer- Ingelheim)

Nueva vacuna liofilizada contra la hidatidosis.

Dra. Verónica Poggio (Tecnovax)

Actualización en vacunas para porcinos.

Msc. Laura Alarcon (Hipra)

16.00 a 17.00: SESIÓN DE PÓSTERS 1: VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS**JUEVES 9/11****9.00 a 10.30: MESA REDONDA:
INMUNODIAGNÓSTICO Y SALUD ANIMAL.**

Limitaciones del diagnóstico inmunoserológico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina en Argentina.

MV. Catalina Gualtieri (LASA Rosario, Santa Fe).

Rutina diagnóstica en el laboratorio de grandes animales. Perspectivas de utilización de nuevas tecnologías.

Msc. José Giraudó (FAV-UNRC, Río Cuarto, Córdoba).

**11.00 a 12.00: SESIÓN DE PÓSTERS 2: ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS E INMUNIDAD FRENTE A
INFECCIONES****12.00 a 13.00: SESIÓN DE PÓSTERS 3: INMUNOINTERVENCIÓN****14.30 a 15.15: CONFERENCIA:
RESPUESTA INMUNE EN PARASITOSIS: TOXOPLASMOSIS-NEOSPOROSIS.**

Dra. María Cecilia Venturini (FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires).

15.15 a 16.00: CONFERENCIA:**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESISTENCIA NATURAL A PATÓGENOS BACTERIANOS DE VIDA INTRACELULAR EN EL GANADO BOVINO.**

Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello (UNAM, México).

16.00 a 16.45: CONFERENCIA:**AVANCES EN INMUNOINTERVENCIÓN**

Probióticos: una alternativa no contaminante para alcanzar altos rendimientos en producción porcina.

Dra. Cecilia Dogi (FCEFQyN -UNRC, Río Cuarto, Córdoba).

17.30: ASAMBLEA GENERAL ORDINARIA DE LA AAIV**19.00: CELEBRACIÓN INAUGURAL****VIERNES 10/11****09.00 a 09.45: CONFERENCIA:****INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES TO *CHLAMYDIA ABORTUS* INFECTION FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.**

(Respuesta inmune innata y adaptativa para la prevención de la enfermedad y el control de la infección por Chlamydia abortus).

Dr. Gary Entrican (Universidad de Edimburgo, Escocia). *Moredum Research Institute*. Edinburg U.K. (VIC-IUIS).

10.15 a 13.00: SIMPOSIO:**LA ENSEÑANZA DE LA INMUNOLOGÍA EN LAS CARRERAS DE GRADO DE VETERINARIA**

Teaching in Veterinary Immunology. *(La enseñanza de la Inmunología Veterinaria).*

Dr. Gary Entrican (Universidad de Edimburgo, Escocia). *Moredum Research Institute*. Edinburg U.K. (VIC-IUIS).

La enseñanza de la Inmunología para Médicos Veterinarios en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello (UNAM, México).

La Inmunología en el *currículum* de la carrera de Medicina Veterinaria. Análisis de datos sobre las diferentes universidades públicas y privadas del país.

Dra. Silvia Mundo (FCV-UBA, C.A.B.A.; AAIV), Dr. Eduardo Mórtoles (UNLP, La Plata, Buenos Aires; AAIV)

La enseñanza de la Inmunología en los nuevos entornos laborales del médico veterinario.

Dra. Ana M. Nicola (Centro Buenos Aires para la Formación de los Servicios Veterinarios, CEBASEV), Dr. Francisco D'Alessio. (Servicio Nacional de Calidad y Seguridad Agroalimentaria, SENASA), Dr. Sebastián Robledo (Federación Veterinaria Argentina, FeVA).

La Inmunología que se enseña, la Inmunología que se aprende.

Srta. Carolina Leto (Alumna de la Carrera de Cs. Veterinaria de la FCV de la UBA).

Inmunopedia. Una nueva plataforma en línea para avanzar en la Educación Global en Inmunología.

Vet. Giselle Ingrata (UBA).

Cierre y conclusiones.

Lic. Fabiana Grinsztajn (UBA), Dra. Lidia Gogorza (UNRN).

14.30 a 15.30: SESIÓN DE PÓSTERS 4: DOCENCIA**15.30 a 16.00: PRESENTACIÓN ORAL DEL TRABAJO PREMIADO****Caracterización de péptidos de proteínas implicadas en la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos que generan inmunidad neutralizante y memoria de larga duración.**

Dr. Mosqueda Joel. Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México).

16.00 a 16.45: CONFERENCIA DE CIERRE**MECANISMOS INFLAMATORIOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL ABORTO CANINO POR *Brucella canis*.**

Dr. Pablo Baldi (FFyB – UBA).–

17.00: CEREMONIA DE CIERRE DEL SIMPOSIO**ENTREGA DE CERTIFICADOS**

CONFERENCIAS PLENARIAS

- **CONFERENCIA INAUGURAL: VACCINES AS DISEASE CONTROL STRATEGIES.**
(*Vacunas como estrategias de control de las enfermedades*).
Dr. Gary Entrican. (Principal Research Scientist, Moredun Research Institute and Honorary Professor, College of Medicine and Veterinary Medicine, University of Edinburgh. Edinburgh, Scotland, UK.)
- **RECOMENDACIONES DE LA COMISIÓN LATINOAMERICANA DE VACUNAS EN ANIMALES DE COMPAÑÍA (COLAVAC).**
Dra. Nélide Gómez (FCV-UBA, C.A.B.A.).
- **VACUNAS RECOMBINANTES EN PEQUEÑOS ANIMALES. VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS**
Dra. Cecilia Figueroa (Boehringer- Ingelheim)
- **RESPUESTA INMUNE EN PARASITOSIS: TOXOPLASMOSIS-NEOSPOROSIS.**
Dra. María Cecilia Venturini (FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires).
- **IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESISTENCIA NATURAL A PATÓGENOS BACTERIANOS DE VIDA INTRACELULAR EN EL GANADO BOVINO.**
Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello (UNAM, México).
- **AVANCES EN INMUNOINTERVENCIÓN**
Probióticos: una alternativa no contaminante para alcanzar altos rendimientos en producción porcina.
Dra. Cecilia Dogi (FCEFQyN -UNRC, Río Cuarto, Córdoba).
- **INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES TO *CHLAMYDIA ABORTUS* INFECTION FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.**
(*Respuesta inmune innata y adaptativa para la prevención de la enfermedad y el control de la infección por Chlamydia abortus*).
Dr. Gary Entrican (Universidad de Edimburgo, Escocia). *Moredun Research Institute*. Edinburgh U.K. (VIC-IUIS).
- **CONFERENCIA DE CIERRE: MECANISMOS INFLAMATORIOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL ABORTO CANINO POR *Brucella canis*.**
Dr. Pablo Baldi (FFyB – UBA, C.A.B.A)

VACCINES AS DISEASE CONTROL STRATEGIES

Vacunas como estrategias de control de las enfermedades

Dr. Gary Entrican

Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Edinburgh, EH26 0PZ, Scotland, UK

Vaccination is an effective method for the prevention and control of infectious diseases of humans and animals. Vaccines need to meet a number of criteria for successful uptake and deployment in their target species. These criteria include safety, efficacy, ease of delivery and cost. The induction of long-lasting protective immunity by single-shot delivery is a highly desirable criterion for livestock species such as sheep for cost-effectiveness. Furthermore, vaccines that can be used in combination with diagnostic tests that discriminate between infected and vaccinated animals (the DIVA principle) are good disease management tools.

However, these criteria can be difficult to meet, particularly

for chronic diseases caused by intracellular pathogens and/or pathogens that inhabit mucosal sites. This is due to difficulties in eliciting the appropriate protective immune response by vaccination. Thus, effective vaccine design and associated diagnostic tests is dependent on knowledge of both the pathogen (for antigen selection) and the host (to identify immune correlates of protection). This presentation will review the different types of vaccines that are licensed for use in sheep and discuss different types of delivery systems and adjuvants that can be used to stimulate humoral and cellular immune responses.

RECOMENDACIONES DE INMUNIZACIÓN PARA LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS PERROS Y GATOS EN ARGENTINA

Dra. Nélide Gómez (FCV-UBA, C.A.B.A.)

Elaboradas por el Comité Argentino de COLAVAC integrado por: Dra. Nélide Gómez, Dra. Silvia Mundo, Dra. Bibiana Brihuega, Dr. Diego Blanco, Dra. Lourdes Francia, Dra. Juliana Stalzer, Dr. Jorge Guerrero (FIAVAC), Dr. Helio Aufran de Moraes, (FIAVAC) y Dr. Javier Mas (AVEACA).

Se desea agradecer especialmente a los miembros del Comité internacional y a los patrocinadores, Zoetis, Merial, Virbac y MSD.

Cuando se aborda el tema vacunación de los animales de compañía es difícil encontrar, en la bibliografía mundial, planteos globales pues es muy complejo y controvertido. Los conocimientos relativos a la inmunización cambian día a día en función de los grandes avances de la inmunología y de la infectología. Si bien se detectan estos avances también se hacen recomendaciones contradictorias. Es posible encontrar quienes recomiendan sólo vacunar a los cachorros, otros que en los adultos indican frecuencias cada 3 años y otros que vacunan anualmente.

Además con frecuencia los propietarios de animales de compañía siguen las recomendaciones de quienes no son médicos veterinarios y suelen manejar las vacunas como si fueran meras inyecciones. La vacunación de los animales de compañía es un acto médico y debe estar en manos del profesional veterinario. Es él quien debe evaluar las condiciones físicas del animal, la posibilidad de contacto con los patógenos, sus antecedentes inmunitarios y en base a estos aspectos, sugerir un plan de vacunación apropiado y eficiente.

La presentación al ámbito veterinario de sucesivas guías de vacunación que se han hecho en USA y en Europa, aportan al profesional veterinario una excelente orientación y una clarificación acerca de todos los aspectos involucrados en el proceso de inmunización.

En el mercado mundial se dispone de muchas vacunas para las enfermedades de los perros y gatos. Según las características del paciente, el médico podría indicar aquellas esenciales y en algunos casos podrá prescribir las opcionales. Cada país o región debe decidir cuáles son esenciales y cuales las opcionales, según las características que adoptan las enfermedades y teniendo en cuenta las condiciones sanitarias y de inmunización. El problema es que si bien las vacunas a múltiples antígenos son útiles y de cómoda aplicación tornan difícil el manejo individual de cada antígeno en cuanto a las vacunas esenciales y las prescindibles. En Argentina teníamos solamente vacunas a múltiples antígenos y recién ahora se están comercializando algunas a uno o dos antígenos en los perros, no ocurre lo mismo con los gatos. Esto limita mucho la posibilidad de hacer una revacunación cada 2 o 3 años de aquellas vacunas esenciales con las que el paciente fue correctamente inmunizado durante su primer año de vida.

También es importante que se evalúen los distintos inmunógenos disponibles en cada área y que se seleccionen los más apropiados a las necesidades del paciente. Cabe aclarar que en nuestro país esto no se ha hecho, ni está implementado el control serológico de la respuesta humoral en los perros y gatos a las vacunas esenciales. Esta situación debería resolverse porque de lo contrario estaríamos aplicando lineamientos que han sido elaborados para otras realidades.

Un tema importante a destacar es que hay países que vacunan a un alto porcentaje de su población canina y felina y por lo tanto la inmunidad poblacional es muy importante. En otros, en cambio, los niveles de vacunación son muy bajos y el nivel de MO en el ambiente es muy alto.

Si bien es cierto que las vacunas podrían conferir una inmunidad mayor a 1 año, el aumento del intervalo entre vacunas no es aplicable a todos los países por igual.

Estos y otros motivos explican porque es conveniente sólo "sugerir" planes de vacunación y dar lineamientos generales respecto de los mismos. Es un tema bien complejo, motivo por el cual es conveniente no adherir ni difundir como verdades absolutas las propuestas que pueden ser útiles para otros países o regiones y no para los propios.

Si bien no contamos con estadísticas nacionales, en el Hospital Escuela de la Universidad de Buenos Aires (sobre 12628 perros y 3688 gatos) hemos calculado un 27% de perros vacunados contra Rabia; un 28% contra Distemper, Parvovirus, Adenovirus y Parainfluenza y 1% contra Leptospira. Con respecto a los gatos un 12% contra Panleucopenia, Calicivirus, Herpes virus; 16% contra Rabia y 1% contra ViLeF. Estos datos son representativos de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, pero probablemente los porcentajes sean menores en el conjunto de perros y gatos del país.

En síntesis, la vacunación es la forma más económica y eficiente de controlar una enfermedad infecciosa. Pero la vacunación no es inocua y debe realizarse un análisis exhaustivo entre el riesgo y el beneficio.

La aplicación de una vacuna genera una alteración del estado de homeostasis y un stress para el sistema inmune del perro y gato, por lo tanto debe administrarse en animales en estado de salud. Los tenedores responsables, antes de dar su consentimiento deben estar informados sobre:

- Las enfermedades que pueden ser prevenidas por las vacunas.
- La ventaja de la vacunación comparada con el tratamiento.
- Los posibles efectos colaterales y complicaciones de la vacunación.
- La posibilidad de falla en la protección.
- El plan de vacunación sugerido con las dosis de refuerzos necesarias.
- La duración de la protección vacunal.

La vacunación es un acto médico y por lo tanto la decisión de efectuarla debe ser tomada por el veterinario.

Consideramos que hay aspectos de la práctica de las vacunaciones que deben ser continuamente revisados y son:

- El plan de vacunación de cachorros, debe ser extendido hasta incluir una dosis a las 16 semanas.
- Los veterinarios deben estimular la vacunación

de los perros y gatos, educando al propietario por diversos mecanismos. Es necesario elevar el % de vacunación para mejorar la inmunidad poblacional. Dichos mecanismos incluyen: elaboración de guías para entregar al propietario; buena explicación del veterinario en la consulta pediátrica o pre-vacunación, e-mails con recordatorios de vacunación, etc.

- La inmunización de base se considera completa luego del refuerzo del segundo año.

- La rutina de la vacunación anual debe ser reevaluada según las herramientas disponibles, considerando que la vacunación del adulto debe ser sugerida en la medida de sus necesidades.

- La evaluación de los anticuerpos séricos post vacunación debiera comenzar a plantearse como guía de re-vacunación, pero teniendo en claro que no es un reflejo completo de la respuesta a la vacuna.

- Los profesionales deben actualizarse regularmente sobre los planes sugeridos de vacunación según las nuevas posibilidades.

- Lo ideal son las vacunas sin adyuvantes, esto debe ser tomado por los laboratorios elaboradores de vacunas a fin de satisfacer este requerimiento.

- Se requiere que haya vacunas individuales disponibles lo que permitiría adaptar mejor el plan vacunal al ambiente y estilo de vida del paciente.

1. DIRECTRICES DE VACUNACIÓN CANINA EN ARGENTINA

VVM virus vivo modificado VM virus muerto BM Bacteria muerta

VACUNAS ESENCIALES	ADMINISTRACIÓN	PRIMER REFUERZO
VVM o Moquillo recombinante + VVM Parvovirus + VVM Adenovirus-2 + Parainfluenza (administrados como un producto combinado)	Se recomiendan 3 dosis entre 6 y 16 semanas de edad. Ejemplo: 8 semanas; y 12 semanas; y 16 semanas de edad.	Administrar una dosis única (de un producto combinado) no más de 1 año después de la última dosis de la serie inicial. Luego podría pensarse en vacunación trianual si se hace serología mejor.
Rabia (VM)	Administrar una dosis única de vacuna contra la rabia no antes de 12 semanas de edad, revacunar anualmente.	Anual por ley
Leptospirosis (BM) 4-serovares	2 dosis iniciales, con 3 a 4 semanas de diferencia. La primera dosis debe administrarse a partir de las 12 semanas de edad. Otra opción que se aplica en Argentina es usar una vacuna con serovares locales recomendada cada 6 meses.	Semestral en lugares de alta prevalencia y anual en el resto. Para Argentina es esencial.
VACUNAS OPCIONALES	ADMINISTRACIÓN	RECOMENDACIONES DE REFUERZO
<i>B. bronchiseptica</i> + virus de parainfluenza (intranasal solamente) (algunos productos IN también pueden contener antígeno CAV-2)	Dosis única (intranasal) a las 12 o 16 semanas de edad. (opcional-algunos autores recomiendan 2 dosis a las 12 y 16 semanas de edad). La vacuna IN puede administrarse tan pronto como las 3 a 4 semanas de edad.	Cuando se mantiene el riesgo de exposición, administrar una sola dosis 1 año después de la última dosis administrada.
<i>B. bronchiseptica</i> solamente (monovalente) > Administración parenteral (BM)	<u>Parenteral</u> (SC): Se requieren 2 dosis, con 2 a 4 semanas de separación.	Cuando se mantiene el riesgo de exposición, administrar una sola dosis 1 año después de la última dosis administrada.

2. DIRECTRICES DE VACUNACIÓN FELINA

VACUNAS ESENCIALES	ADMINISTRACIÓN	PRIMER REFUERZO
VVM Panleucopenia + VVM Herpesvirus + VVM Calicivirus+	2 y 3 meses. Y <i>una dosis adicional a las 20 semanas de edad</i> donde el riesgo de exposición es alto.	No más de 1 año después de la última dosis de la serie inicial. Repetir anualmente (no tenemos antígenos separados).
Rabia VM [con adyuvante]	Una sola dosis generalmente administrada a las 12 ó 16 semanas. (Se aplica la ley nacional).	Administrar 1 vez por año (se aplica la ley nacional).
VACUNAS OPCIONALES	ADMINISTRACIÓN	RECOMENDACIONES DE REFUERZO
Virus recombinante de la leucemia felina (ViLeF) [sin adyuvante]	“Altamente Recomendada” para todos los gatitos: Administrar 1 dosis tan pronto como las 8 semanas de edad seguida de una segunda dosis 3-4 semanas después. Refuerzo 1 año después. Se recomiendan 2 dosis a las 12 y 16 semanas, seguido de un refuerzo 1 año después de la finalización de la serie inicial.	Cuando exista el riesgo de exposición... administrar una sola dosis anual de allí en adelante. Se podría recomendar la revacunación cada 2 años para los gatos considerados de tener “bajo riesgo” de exposición.
Virus de la leucemia felina VM [con adyuvante]		
Virus de Inmunodeficiencia Felina Inactivado (VIF)	En Argentina no hay vacuna y de haber no serviría pues tenemos subtipos B y E y la vacuna protege para el subtipo A.	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> Felino (VVM Intranasal (sin adyuvante)	No hay vacuna en Argentina y la casuística es baja.	
<i>Chlamydophila felis</i> Felino	En Argentina la usamos en combinación con Herpes Calicivi y Panleucopenia.	
Calicivirus Virulento Sistémico (VS) VM con adyuvante	No hay vacuna en Argentina y la casuística es baja.	

VACUNAS RECOMBINANTES EN PEQUEÑOS ANIMALES. VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS

Dra. Cecilia Figueroa (Boehringer- Ingelheim AH Argentina S.A.)

cecilia.figueroa@boehringer-ingenelheim.com

Desde la variolización en el año 1798, Edward Jenner cambió la historia demostrando que a través de este método podía proteger a numerosas personas contra la viruela humana. Luego en 1885 fue el turno de Luis Pasteur, quién dio un gran paso en la historia de las vacunas al demostrar que al administrar una forma atenuada del microorganismo que produce la infección se consigue una mejor protección que con la variolización, desarrollando la vacuna contra la Rabia para prevenir dicha infección que era altamente frecuente y mortal en dicho año. En la década de 1920, también se desarrollaron importantes vacunas para la época contra Difteria, Tos convulsa, Tuberculosis y Tétanos. En 1953 James Watson y Francis Crick descifran la doble hélice del ADN, posibilitando la comprensión de la interacción entre los microorganismos infecciosos y el sistema inmunológico. Y en 1997 se lleva a cabo el avance científico de la Tecnología Recombinante, en dónde se aíslan y se transfieren secuencias específicas de ADN y/o ARN (genes) de un microorganismo y se lo recombina con el ADN de otro. Con la llegada de la Tecnología Recombinante ingresamos en una nueva era de la Inmunología. La generación de este tipo de vacunas no solo se debe a la capacidad de aislar secciones exactas del material genético de un virus dado, sino también en la elección de un vector seguro en términos biológicos como es el Canary Pox ya que no es patogénico para los huéspedes mamíferos porque no se replica en ellos y es lo suficientemente grande para recibir material genético de otro microorganismo. La producción de la

vacuna Recombinante tipo 3 para Distemper, comienza con la selección, aislamiento y extracción de los fragmentos que codifican para el Ag protector del virus del objetivo. Estas son las proteínas codificantes para ARN expresadas en la superficie de una célula. HA (hemoaglutinina) y F (fusión) del virus Moquilo. A través del proceso de transcripción inversa, esas secuencias de ARN son transformadas en una copia de ADN copia del ARN original. Estas copias de ADN son insertadas in vitro en el genoma del Canarypox creando la semilla original del virus objetivo. Luego se replican en un cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo para producir el virus vacunal. Dicho virus es administrado al huésped como vacuna infectando sus células. Cuando el ADN viral intenta replicarse en la célula huésped que lo contiene, el proceso fracasa dado que no logra realizar un ciclo de replicación completo para generar nuevas partículas virales. Sin embargo todos los genes que fueron insertados se transcriben, resultando en la producción de las proteínas objetivos HA y F, que son posteriormente expuestas en la superficie de la misma célula del huésped. Luego los macrófagos y/o células dendríticas presentan a los linfocitos los Ag. vacunales, desencadenando el proceso natural de reconocimiento del proceso inmune de proteínas extrañas. La inmunidad resultante es humoral y mediada por células. Lo mismo ocurre con el virus de la Leucemia Felina, sólo que cambian los nombres de las proteínas que en este caso se denominan ENV y GAG.

RESPUESTA INMUNE EN PARASITOSIS: TOXOPLASMOSIS-NEOSPOROSIS

Dra. María Cecilia Venturini

Laboratorio de Inmunoparasitología. FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires

cventuri@fcv.unlp.edu.ar

Al referirnos a la inmunidad frente a los parásitos debemos considerar sus ciclos de vida complejos con distintos estados y estadios y el consecuente cambio en su composición antigénica. En el caso particular de los protozoos de vida intracelular *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, han desarrollado mecanismos de evasión para protegerse de la respuesta inmune, ubicándose en el interior de vacuolas parasitóforas. Por otra parte, sus formas de resistencia, los quistes tisulares, se alojan en zonas inmunológicamente privilegiadas, a las que no acceden con facilidad las células de la inmunidad involucradas en la protección. Si bien ambos protozoos son microscópicamente indistinguibles, lo son desde el punto de vista estructural y antigénico, así como en relación con su predilección por determinados hospedadores. En Argentina se han aislado y caracterizado genotipos de *T.gondii*, típicos y atípicos, y aislados de *N.caninum* genéticamente diferentes. Esta diversidad genética puede relacionarse con virulencia variable y por lo tanto con nuevos desafíos en el estudio de la respuesta inmune frente a ellos. Las poblaciones CD4 Th1, Th2, Th17, Th1, LT $\gamma\delta$ y CD8, son importantes en diferentes etapas de la infección. Ambos producen abortos en diferentes especies productivas. Mientras que las hembras ovinas infectadas con *T.gondii*, resultan inmunes en preñeces sucesivas, las

cabras sufren abortos a repetición. Las pérdidas económicas derivadas de la infección por *N.caninum* en hembras bovinas preñadas, han dado lugar a numerosas investigaciones sobre la respuesta inmune en diferentes etapas de la gestación, para tratar de intervenir con estrategias de prevención. Se ha analizado la expresión e importancia de los Toll Like Receptors (TLR 3, 7, 8) endosómicos en la placenta de vacas preñadas infectadas con *N.caninum*. Durante la preñez las citoquinas proinflamatorias producidas por los LTh1 a través del eje IL12, especialmente el INF γ , limitan la proliferación de los taquizoítos, pero al generar daño en la placenta son responsables de pérdidas tempranas. En etapas más avanzadas de la gestación predominan las citoquinas progestacionales y reguladoras. Este hecho, se suma a la mayor madurez del sistema inmune del feto, que aunque puede infectarse congénitamente, tiene mayores probabilidades de sobrevivir. Algunos países utilizan vacunas atenuadas para prevenir el aborto por *T.gondii* en ovinos. La tendencia actual para *N.caninum* es diseñar vacunas atenuadas capaces de evitar la transmisión transplacentaria, considerando además la importancia de diferenciar animales vacunados de infectados.

AVANCES EN INMUNOINTERVENCIÓN

Probióticos: una alternativa no contaminante para alcanzar altos rendimientos en producción porcina

Dra. Cecilia Dogi

FCEFQyN. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 3 Km 601.

cdogi@exa.unrc.edu.ar

A nivel mundial, la carne de cerdo es una de las preferidas por los seres humanos, y según estimaciones, se espera que su consumo siga aumentando conforme crezca la población. La región Pampeana, integrada por las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa, es la principal productora de cerdos del país. En nuestro país se observa un fuerte crecimiento anual, sin embargo, sigue siendo bajo respecto del promedio internacional, por ello que dentro del Plan Estratégico Agropecuario y Agroindustrial, se busca aumentar estos valores. Una de las asignaturas pendientes en producción porcina es la eficiencia de conversión de alimentos en carne, la cual va de la mano con la sanidad porcina. El destete es un período de estrés, en el cual los mamíferos jóvenes deben hacer la transición de la dependencia materna y de la alimentación láctica hacia una reorganización social. Los lechones son generalmente destetados antes de haber desarrollado completamente su sistema inmune con lo cual hay mayor susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas debido al estrés.

En la última mitad del siglo XX, se desarrollaron nuevos conceptos para promover la salud animal y asegurar el rendimiento en el crecimiento, eficiencia en la alimentación, y calidad del producto. La Comunidad Europea ha prohibido completamente el uso de antibióticos desde el 2006, ubicando a los probióticos como alternativa no contaminante para alcanzar estándares de sanidad y rendimiento productivo. Nuestros estudios permitieron demostrar que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* RC016, aislada de intestino de cerdos sanos, es capaz de estimular el sistema inmune y modular la microbiota intestinal en ratones. Asimismo, ensayos llevados a cabo en cerdos, demostraron que esta cepa fue capaz de mejorar los parámetros productivos y la fisiología del ecosistema intestinal. La administración de *S. cerevisiae* RC016 surge como una nueva estrategia alimentaria destinada a mejorar los parámetros productivos y modular el ecosistema intestinal al destete, minimizando el uso de antibióticos como promotores de crecimiento.

INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES TO *CHLAMYDIA ABORTUS* INFECTION FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL

(Respuesta inmune innata y adaptativa para la prevención de la enfermedad y el control de la infección por *Chlamydia abortus*)

Dr. Gary Entrican

Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Edinburgh, EH26 0PZ, Scotland, UK. (VIC-IUIS).

Chlamydia abortus is an obligate intracellular Gram-negative bacterial pathogen that causes ovine enzootic abortion (OEA). OEA affects most sheep-rearing countries worldwide, with outbreaks resulting in lamb losses of up to 30% in a single season. One of the major challenges in controlling OEA is the ability of *C. abortus* to infect non-pregnant ewes and persist in a subclinical, undiagnosed state until the subsequent pregnancy. There are existing live-attenuated and whole-killed vaccines that can prevent OEA, but these have drawbacks and interfere with diagnosis as there are currently no diagnostic tests that discriminate between infected and vaccinated animals (DIVA tests). Thus, there is a need to develop new control strategies for OEA. Subunit vaccination is a desirable goal, which requires knowledge of the protective pathogen antigens and the

protective host immune response. We have demonstrated that cell-mediated immunity is important for controlling *C. abortus* infection, particularly Th1-type cellular immunity typified by interferon-gamma (IFN- γ) production. IFN- γ prevents the growth of *C. abortus* by restricting availability of intracellular pools of tryptophan. IFN- γ can be produced by both innate and adaptive cells of the immune system, with adaptive cells being the primary target for vaccine-induced immunity.

We describe technologies for measuring IFN- γ , identifying the cells that produce it and how these features correlate with protection in vitro and in vivo.

MECANISMOS INFLAMATORIOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL ABORTO CANINO POR *BRUCELLA CANIS*

Dr. Pablo Baldi

IDEHU, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. Junín 956 4to piso, 1113 Buenos Aires.

pablobal@ffyb.uba.ar

La infección por *Brucella canis* es una causa importante de aborto en perras preñadas. Aunque no se conocen los mecanismos fisiopatológicos involucrados, se ha reportado que el tejido placentario presenta infiltrados inflamatorios y que los trofoblastos presentan una alta carga bacteriana intracelular. Es sabido que las placentitis se vinculan con el aborto inducido por virus y bacterias, y que en estos procesos tiene un papel central la respuesta inflamatoria montada por los trofoblastos. Nos propusimos entonces caracterizar la producción de mediadores inflamatorios por los trofoblastos caninos en respuesta a la infección por *B. canis*. Las células fueron aisladas por digestión enzimática y centrifugación diferencial a partir de placentas obtenidas de gestaciones normales a término. A distintos tiempos luego de la infección in vitro, las células se lisaron para cuantificar bacterias intracelulares viables y se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo para medir citoquinas. También se midió la producción de citoquinas en trofoblastos estimulados con medio condicionado (MC) de monocitos y

neutrófilos caninos de sangre periférica, infectados in vitro con *B. canis*. Los estudios demostraron que *B. canis* infecta y replica en trofoblastos caninos primarios, generando a su vez un incremento en la secreción de interleuquina 8 (IL-8, atrayente de neutrófilos) y de RANTES (o CCL5, atrayente de diversos leucocitos). El estímulo de los trofoblastos con MC indujo también un incremento significativo de IL-8, RANTES e IL-6. La infección in vitro de explantos de placentas caninas normales también indujo un aumento en la producción de estos mediadores, y de la citoquina proinflamatoria TNF- α . Estos resultados sugieren que los trofoblastos caninos responden a la infección por *B. canis* produciendo quemoquinas que atraerían neutrófilos y monocitos al sitio de infección, y que estos fagocitos, ante el contacto con la bacteria, producirían factores que incrementan aún más la respuesta inflamatoria de los trofoblastos. Estos procesos podrían contribuir a la placentitis y el aborto inducido por *B. canis*.

MESA REDONDA

- **ACTUALIZACIONES EN INMUNOPROFILAXIS**

Nuevas tecnologías en vacunas aviarias.

Dr. Angel Menendez (Boehringer- Ingelheim)

Nueva vacuna liofilizada contra la hidatidosis.

Dra. Verónica Poggio (Tecnovax)

Actualización en vacunas para porcinos.

Msc. Laura Alarcon (Hipra)

- **INMUNODIAGNÓSTICO Y SALUD ANIMAL**

Limitaciones del diagnóstico inmunoserológico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina en Argentina.

MV. Catalina Gualtieri (LASA Rosario, Santa Fe).

Rutina diagnóstica en el laboratorio de grandes animales. Perspectivas de utilización de nuevas tecnologías.

Msc. José Giraudo (FAV-UNRC, Río Cuarto, Córdoba).

INMUNODIAGNÓSTICO Y SALUD ANIMAL

Limitaciones del diagnóstico inmunoserológico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina en Argentina

Méd. Veterinaria Catalina Gualtieri

Directora Técnica Laboratorio LASA Rosario

Ex Profesora Adjunta de Sueros y Vacunas. Facultad de Cs, Veterinarias. U.N.R.

ruca75@hotmail.com.ar

A pesar de que la esencia del diagnóstico inmunoserológico es la respuesta inmune, y esta atravesado por los conocimientos de la misma desde su desarrollo hasta su implementación e interpretación, no es sencillo abordar este tema en una reunión científica de Inmunología -*Lo complejo es cómo ubicarlo en este contexto desde la práctica de los laboratorios privados*-. Mucho más sencillo es presentarlo en reuniones de laboratorios, donde el diagnóstico es el centro de todas las exposiciones y debates.

Por esto quiero ubicar el tema en el marco de las posibilidades diagnósticas de los laboratorios privados, la mayoría sin alta tecnología o sin las posibilidades que tienen los centros de investigación y desarrollo, o los centros de referencia. Del mismo modo apelar a la necesidad de que desde estos centros se desarrollen nuevos biológicos, como vacunas marcadas, entre otras, acompañados de kit diagnósticos que se adapten a la realidad de nuestro país. También dejar algunas consideraciones en estos temas para que puedan ser tenidas en cuenta en la formación de los estudiantes, futuros profesionales, fundamentalmente para que comprendan la necesidad de conocer en profundidad las enfermedades y el contexto epidemiológico en el que se presentan. Solo desde ese lugar el laboratorio puede resultar una herramienta útil que colabore en el diagnóstico y por consecuencia en la prevención y el control de las mismas.

Elegí estas dos enfermedades porque de alguna manera resumen los principales inconvenientes que se plantean en el laboratorio a la hora de elegir una técnica y poder interpretarla, de forma que realmente le sirva al productor y/o propietario, al profesional y justifique su inversión.

El inmunodiagnóstico de IBR y DVB, está incluido junto con el de otros agentes que directa o indirectamente pueden comprometer el tracto reproductor de las hembras así como el desarrollo embrionario y fetal, en el llamado "diagnóstico de síndrome reproductivo", pero también es requerido por los profesionales en problemas respiratorios, forman parte del Complejo Respiratorio Bovino, en muertes de terneros, en la aparición de trastornos nerviosos y otros cuadros clínicos. El verdadero impacto económico que producen se desconoce, ya que es difícil de cuantificar, debido a que la mayoría de las veces producen pérdidas solapadas o en goteo, y en general en combinación con otros patógenos que impiden valorar cual es el impacto relativo de cada uno. Por otro lado, en nuestro país carecemos de registros sistemáticos y de una política oficial de prevención para estas enfermedades.

Las limitaciones en el diagnóstico inmunoserológico de estos virus, refieren a diferentes aspectos que inciden e influyen el mismo y que se deben considerar al momento de solicitarlo e interpretarlo:

§ Las dos enfermedades tienen una elevada prevalencia a nivel mundial, del mismo modo que en los rodeos de nuestro país. Entre 60 y 80% de los rodeos son seropositivos, y hay otros trabajos de relevamiento

serológico con porcentajes aún mayores. En todos los casos con alta prevalencia intrapredial que puede superar el 90% de animales positivos.

§ Ambas producen cuadros clínicos muy variados, con diferentes presentaciones, difícil de definir por la clínica y con la necesidad de acudir a estudios complementarios.

§ Las dos enfermedades son inmunoprevenibles, para ambas, en nuestro país hay vacunas inactivas disponibles, la mayoría de las cuales viene en presentaciones combinadas con otras, no son vacunas marcadas (no DIVA), por lo que no se puede diferenciar animales vacunados de infectados, y se aplican con frecuencia en muchos establecimientos (revacunaciones periódicas).

§ En algunos casos hay cierto desconocimiento, por parte de los profesionales, de aspectos epidemiológicos básicos y de la dinámica de estas infecciones, que tienen implicancia directa en la interpretación del diagnóstico, así como la elección de la muestra a remitir.

En IBR la alta prevalencia, asociada a circulación vírica, las infecciones latentes, que dan lugar a re infecciones endógenas repetidas en el transcurso de la vida del animal, las distintas categorías etarias afectadas, la amplia distribución temporo-espacial y la aplicación de vacunas no marcadas.

En el complejo Diarrea Vírica Bovina (DVB), Enfermedad de las Mucosas (EM) y Síndrome Hemorrágico (SH), la epidemiología tiene similitudes y diferencias según cada una, y depende de los biotipos y genotipos del virus.

- DVB, es producida por cepas no citopáticas (NCP) del genotipo 1, tiene también una prevalencia alta, el virus esta presente en la mayoría de los rodeos, se presenta con alta morbilidad y baja mortalidad, afecta distintas categorías etarias y el uso de vacunas puede también colaborar en dificultar el diagnóstico.

- La epidemiología de EM es totalmente diferente, se presenta en animales persistentemente infectados (PI) con cepas NCP, entre los seis meses y los dos años, fundamentalmente por mutación de la cepa NCP a citopáticas (CP). Presenta morbilidad muy baja, solo 0.5 o 2% de animales de un rodeo infectado con vDVB puede ser PI y desarrollar la enfermedad, y la mortalidad siempre es muy alta. Los animales con EM son PI (eliminan virus durante toda su vida) y seronegativos, excepto en muy jóvenes donde pueden ser seropositivos por la presencia de anticuerpos calostroales. Las madres pueden ser seronegativas, si son PI o seropositivas si se infectaron durante la gestación de esa cría.

- El SH, que puede confundirse por la signología clínica con EM, es producido por cepas del genotipo 2, no siempre contenidas en las vacunas. Estas cepas presentan diferencias con el genotipo 1 a nivel de las proteínas estructurales, no habiendo inmunidad de protección cruzada o habiendo solo parcialmente, por lo que es fundamental que las vacunas incluyan los dos genotipos. En nuestro país, si bien hay vacunas que contienen los dos genotipos, la mayoría solo contienen el genotipo 1. La morbilidad puede

ser alta o media y la mortalidad es alta. Dependiendo de la etapa de la infección los animales pueden ser seronegativos, en los primeros días y luego seropositivos.

Por último las distintas cepas del vDVB también pueden infectar otras especies silvestres y domésticas, como los ovinos, las que pueden actuar como reservorios y fuente de virus.

§ Cada una presenta particularidades respecto de las patogenias.

En el caso de IBR, hay que remarcar el ingreso principalmente por mucosas, aunque pueden ser otras vías, la latencia, la reactivación a nivel de mucosas y la forma de diseminación dentro del organismo, fundamentalmente por puentes intercelulares y en menor medida por una viremia endocelular.

En DVB, a excepción de los animales infectados in útero, la mayoría de los bovinos son inmunocompetentes frente al virus y pueden controlar exitosamente la infección natural, desarrollando anticuerpos y eliminando el virus de su organismo. No hay fenómeno de latencia. Prácticamente todas las vías están descriptas para el ingreso del virus, que replica en células del tracto respiratorio superior y esencialmente en células de tejidos linfoides, linfocitos y monocitos, de allí su efecto inmunodepresor y hace viremia endo y exocelular. Muy similar o idéntica es la patogenia del SH.

En EM, la patogenia es totalmente diferente. Se considera la secuela fatal de una infección intrauterina. La infección de una hembra no inmune entre los 30 / 120 días de gestación con cepa NCP, puede dar lugar al nacimiento de un ternero PI, inmunotolerante. También puede darse en la gestación de una hembra PI. Un PI con una superinfección con cepas CP desarrolla EM. También puede darse en PI vacunados con vacunas activas, pero estas no están disponibles en nuestro país.

§ Elección de las muestras a remitir. Desde las aulas, durante la formación, y desde el laboratorio, permanentemente se explica que en enfermedades de rodeo es fundamental enviar un porcentaje de muestras del mismo, donde estén representados las distintas categorías etarias, animales que presentan signos del problema a investigar, animales convalecientes y animales aparentemente sanos o que no manifiestan signos, y que no sirve el envío de una sola muestra o de unas pocas muestras y menos aún muestras solo de los animales con problemas. Del mismo modo, se expone las ventajas de implementar como una práctica habitual en los establecimientos a manejar, estudios de seroperfiles o de relevamiento predial que permitan conocer cuales son los patógenos que circulan, tener una estimación aproximada de las prevalencias, así como un registro de los títulos promedios de anticuerpos en esa población. Esto nos permitirá tener una base de referencia ante la presentación de un problema. Por último, la importancia de que todas las muestras deban ser acompañadas con un historial, lo más completo posible del establecimiento, del manejo sanitario y del problema que se presenta.

Lo cierto es que en la práctica, la mayoría de las veces se recibe una muestra o unas pocas, con poca o nada de información que acompañe a la misma y con urgencia para tener una respuesta.

§ Objetivo del diagnóstico requerido: es importante tener en claro que se persigue con el mismo, saber cual es la finalidad del profesional con los resultados que obtiene. Si es conocer el agente causal de un problema, que es lo más frecuente en el envío de muestras al laboratorio, debemos tener presente que, en el caso de problemas reproductivos (la mayor casuística se trata de problemas reproductivos), la identificación de las causas solo se logra en menos del 40% de los casos. Una de las razones es que

en las enfermedades virales, también para algunos otros agentes, la infección ocurre tiempo antes de la evidencia de los signos clínicos (aborto, infertilidad, etc.), y por lo tanto el pico de anticuerpos ocurre antes y no es posible detectar la mentada seroconversión en muestras pareadas, que por lo general se toman en el momento del aborto y 15 a 30 días después. Se suma además, la dificultad en rodeos de cría o en explotaciones extensivas de obtener dos muestras de suero de un mismo animal.

Por otro lado en algunas infecciones los títulos pueden persistir durante toda la vida útil del animal (ejemplo DVB) y en otras si bien los animales permanecen infectados, los títulos pueden ser fluctuantes (IBR entre otros), lo que ayuda a complicar la interpretación.

Cuando el objetivo es el control, se debe partir de premisas diferentes para DVB e IBR. Mientras que en este último caso el primer paso para el control sería la disminución de la seroprevalencia, ya que consideramos un animal seropositivo como infectado y posible difusor de la infección, en DVB, un animal seropositivo normalmente no contagia la enfermedad. Sin embargo la existencia de animales PI, portadores y diseminadores del virus durante toda su vida, hace que un rodeo con una prevalencia muy elevada sea sospechoso de la presencia de un PI y en este caso la detección y eliminación de estos animales es la base del control.

Lo cierto es que para nuestra realidad, plantearse el control eliminando animales infectados es prácticamente una utopía que de lograrse sería muy difícil de sostener en el tiempo.

§ Serodiagnóstico: técnicas disponibles e interpretación: si bien para ambas enfermedades hay varias técnicas diagnósticas disponibles para la detección de anticuerpos, nos referiremos a los ELISAs que son más utilizados en los laboratorios de mediana complejidad.

o Para IBR, las técnicas de ELISA indirecto, no diferencian entre anticuerpos vacunales o por infección. Las particularidades de la patogenia que mencionamos anteriormente, fundamentalmente la latencia, junto a la alta prevalencia, a la utilización de vacunas no marcadas y a las revacunaciones frecuentes, en la mayoría de los casos en animales que ya están infectados, con infección aguda o latente, hace que los anticuerpos detectados por las pruebas diagnósticas sean difíciles de interpretar. De todas maneras si tenemos un muestreo estratificado o conocimiento previo del estado serológico y observamos diferencias de títulos importantes entre los problemas y los testigos o entre el promedio de los registros de base y el de los animales afectados, los resultados podrían tener otro valor.

La detección de anticuerpos en fluidos de fetos abortados no siempre resulta posible, por un lado en las patologías virales es muy frecuente la muerte embrionaria o abortos de fetos chicos que o no se encuentran para enviarlos o por no ser inmunocompetentes y no poder montar aún una respuesta inmune pueden dar resultados falsos. Causas estas de que muchas veces sean sub diagnosticadas. Por otro lado, en fetos mayores a los cuatro o cinco meses, que son los que mayormente se remiten al laboratorio, hay que ser cautos en la interpretación de una serología positiva. Un trabajo de la Dra. A. Cipolla donde se investigó en fluidos fetales de 95 fetos abortados, de aproximadamente 7 meses, la presencia de anticuerpos para DVB, IBR, Leptospirosis, *B. abortus* y *N. caninum*, detectaron anticuerpo contra alguno de estos patógenos en 65/95 (68.4%), y en 32/95 (33.7%) se detectaron anticuerpos a más de un agente, sugiriendo la exposición fetal a múltiples antígenos durante la gestación. Por último hay que tener presente que muchos ELISAs no están validados para fluidos fetales, por lo que también por esto hay que tener cautela en la interpretación de

resultados. Al parecer, según algunos autores, los fetos tienen anticuerpos anti-peroxidasa (enzima unida a la anti-IgG bovina usada como conjugado) y no es posible utilizar la técnica de ELISA porque van a dar negativos, y pueden ser falsos negativos.

Otro punto a considerar es que, como para muchas otras enfermedades en terneros menores de seis meses, los anticuerpos calostrales pueden dar resultados falsos positivos y animales con infecciones latentes pueden dar falsos negativos, hasta por períodos de dos años, tiempo que puede durar la latencia.

o En el diagnóstico de DVB y SH, si bien el más utilizado es un ELISA de bloqueo que identifica anticuerpos contra una proteína no estructural, la Pr-80 o NS3, que no debiera estar presente en las vacunas inactivadas, no se puede aseverar que no se generen anticuerpos contra ella en animales vacunados no infectados, como resultado de la presencia en la vacuna de algo de proteína residual, producto de la replicación del virus durante el proceso de elaboración de la vacuna. Más aún en animales que recibieron varias vacunas. Hay que asegurar un proceso de ultra centrifugación efectivo para que no queden trazas contaminantes de proteínas no estructurales en el producto final. Tecnología que no todos los laboratorios productores disponen.

Por lo que no podemos tener certeza sobre el origen de los anticuerpos en resultados seropositivos, si bien esta técnica, discrimina entre positivos y negativos, títulos altos en animales con problemas y bajos o nulos en los testigos, podrían asociarse con la posible causa del problema o indicar al menos que el virus puede estar presente y formar parte del mismo, porque como dijimos en la mayoría de los casos son multifactoriales y este virus por producir inmunodepresión puede actuar como agente primario, abriendo las puertas para otros microorganismos. Según el laboratorio que fabrica el kit, los animales con anticuerpos producto de las contaminaciones de vacunas con Pr-80 deberían caer en la categoría de sospechosos y en muestreos posteriores ser negativos. En la práctica nosotros vemos un alto porcentaje de animales seroreactivos y prácticamente no encontramos establecimientos que sean totalmente seronegativos, aún

con un historial largo de aplicación de vacunas, que haría suponer un control de la circulación vírica. Y pocas veces encontramos asociación clara entre títulos y animales con o sin problemas.

Por lo que acabamos de mencionar, con estos kit diagnóstico, cobran importancia más que los seropositivos, los animales seronegativos, ya que si bien es muy probable que un alto porcentaje sean realmente negativos, hay otros que pueden ser potencialmente PI, inmunotolerantes, diseminadores de grandes cantidades de virus. Pero como tampoco tenemos certeza, estos animales deben seguir siendo estudiados, con nuevas serologías y/o buscando virus o detección de antígenos virales. Para diferenciar si un aislamiento es de animales con infección aguda o de PI, hay que repetir el diagnóstico 3-4 semanas después, los PI siguen eliminando altos títulos, los otros solo por 2-3 semanas.

El análisis serológico de muestras tomada al azar de terneros entre 6 y 12 meses de edad permite distinguir rodeos con infección activa, de rodeos sin bovinos PI, con un alto grado de seguridad. La presencia de un animal PI produce una respuesta rápida de anticuerpos en los animales que están en contacto. Hay que recordar que si bien la vacuna por sí sola no elimina el virus del rodeo, su finalidad es proteger contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI.

Por último, cómo diferenciar casos de EM de casos de SH. Aquí hay que tener presente que si bien la signología clínica es muy parecida, en ambas la mortalidad es alta, existen diferencias que pueden ayudarnos a interpretar el cuadro. Por un lado, en EM por su origen y patogenia la morbilidad es muy baja, difícilmente se presente en forma de brote y los animales son seronegativos. En estos casos es muy importante la detección del virus o de Ag virales. En el SH, la morbilidad es media o alta y excepto en los inicios de la infección los animales son seropositivos. Aquí además de buscar el virus o Ag viral hay que enviar muestras a los centros de referencia para genotiparlo, recordando que el SH es producido por genotipo 2.

Laboratorios privados de diagnóstico para animales domésticos. Perspectivas de utilización de nuevas tecnologías

Profesor José Ángel Giraudo

(Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto). CP 5800.

jgiraudo@ayv.unrc.edu.ar

Por las políticas sanitarias del SENASA, a partir de 1980 en Argentina comenzaron a crearse laboratorios de diagnóstico veterinario privados. Hoy el país cuenta con una red de 300 laboratorios de diagnóstico consolidados y reconocidos por la autoridad sanitaria que responden a la demanda de trabajo en casi todas las regiones ganaderas. De la totalidad de laboratorios reconocidos por el SENASA los hay de baja, media y alta complejidad técnica. Por otro lado existen diferentes orientaciones técnicas, siendo en su mayoría diversificados para grandes y pequeños animales. La mayoría de los laboratorios tienen un carácter regional, recibiendo trabajos de su territorio y limitado a los medios de movilidad que le permitan al veterinario enviar sus muestras con facilidad y comodidad (colectivos, comisionistas, otros medios). Todos los laboratorios habilitados por el SENASA poseen un director técnico y deben cumplir con una serie de requisitos mínimos en infraestructura edilicia, equipamiento y capacitación de su personal. También deben aplicar buenas prácticas de laboratorio. Por último deben contar con la habilitación oficial para poder ejecutar diagnósticos en cada enfermedad que el SENASA tiene legislada bajo un Plan Nacional. Estas enfermedades en la actualidad son Brucelosis, Enfermedad de Aujeszky, Anemia Infecciosa Equina, Leucosis Bovina y Trichinelosis. Muchos laboratorios de alta complejidad técnica cuentan con las áreas de bacteriología, virología, micología, serología, parasitología, patología macroscópica e histopatológica, análisis clínico, análisis químicos y biología molecular.

Nuevas y viejas tecnologías que deberían aplicarse masivamente: PCR (reacción en cadena de la polimerasa): si bien es una técnica que ya posee sus años recién en la última década ha sido lentamente incorporada en la rutina de algunos pocos laboratorios. En la actualidad se utiliza para caracterizar agentes bacterianos de aislamientos (por ejemplo determinar serotipos de *Pasteurella multocida*, *Bordetella*, *Histophilus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Actinobacillus* y otros géneros de bacterias). También es muy utilizado para diferenciar *Trichomonas* de origen genital y digestivo. Menos utilizada para el diagnóstico virológico de rutina sobre especímenes y para determinar algunas bacterias de muestras clínicas. Histopatología: si bien esta técnica posee muchísimos años de utilización,

en los laboratorios de diagnóstico veterinario privados es poco utilizada por la escasez de técnicos especializados en la preparación de cortes y lectura posterior. Esta técnica diagnóstica es invaluable para el apoyo del diagnóstico de patologías nerviosas, tumorales y tóxicas en todas las especies. Por otro lado permite mejorar la eficacia diagnóstica de las causas de abortos. Inmunohistoquímica: también una técnica con historia, que permite mejorar el diagnóstico virológico y parasitario en muchas enfermedades de todas las especies. Tiene el inconveniente de no contar fácilmente con anticuerpos marcados en el mercado.

Estrategias para mejorar la eficacia del diagnóstico sobre fetos bovinos: en el mundo, la eficiencia diagnóstica para definir las causas de pérdidas reproductivas por abortos, fetos prematuros, natimortos y pérdidas perinatales varía del 30 al 45%, dependiendo principalmente del sistema productivo y de las enfermedades existentes en cada país. La histopatología es una herramienta diagnóstica importante para casos de fetos abortados donde la autólisis es marcada y resulta limitante para el aislamiento microbiológico. Estudios recientes indican que la mayoría de los casos con diagnóstico indeterminados presentaban lesiones histopatológicas compatibles con las producidas por un agente infeccioso. El severo grado de autólisis con que los fetos o neonatos llegan al laboratorio para ser procesados es un factor adverso para un exitoso cultivo bacteriano y viral, requiriendo a futuro el empleo de técnicas de biología molecular (ej.: PCR) para mejorar dicho aspecto. Dentro de las causas no infecciosas resultó difícil establecer las etiologías de origen tóxicas, genéticas o ambientales. La información anamnésica es muy importante para esclarecer alguno de estos casos. La serología a partir de los fluidos fetales para detectar anticuerpos contra *Neospora caninum*, *Leptospira* sp y virus (HVB/DVB) también resulta útil para conocer si existió la respuesta fetal a dichos agentes etiológicos. El estudio serológico dirigido, también aporta información esclarecedora para enfermedades como Leptospirosis, Neosporosis y virales (HVB/DVB). Deben tomarse muestras de sangre de animales abortados e igual cantidad de animales clínicamente sanos con similar edad gestacional de las abortadas.

**SIMPOSIO:
LA ENSEÑANZA DE LA INMUNOLOGÍA
EN LAS CARRERAS DE GRADO DE
VETERINARIA**

- **Teaching in Veterinary Immunology.** (*La enseñanza de la Inmunología Veterinaria*).
Dr. Gary Entrican (Universidad de Edimburgo, Escocia). Moredun Research Institute. Edinburgh U.K. (VIC-IUIS).
- **La enseñanza de la Inmunología para Médicos Veterinarios en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.**
Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello (UNAM, México).
- **La Inmunología en el currículum de la carrera de Medicina Veterinaria. Análisis de datos sobre las diferentes universidades públicas y privadas del país.**
Dra. Silvia Mundo (FCV-UBA, C.A.B.A.; AAIV), Dr. Eduardo Mórtola (UNLP, La Plata, Buenos Aires; AAIV)
- **La enseñanza de la Inmunología en los nuevos entornos laborales del médico veterinario.**
Dra. Ana M. Nicola (Centro Buenos Aires para la Formación de los Servicios Veterinarios, CEBASEV), Dr. Francisco D'Alessio. (Servicio Nacional de Calidad y Seguridad Agroalimentaria, SENASA), Dr. Sebastián Robledo (Federación Veterinaria Argentina, FeVA).
- **La Inmunología que se enseña, la Inmunología que se aprende.**
Srta. Carolina Leto (Alumna de la Carrera de Cs. Veterinaria de la FCV de la UBA).
- **Inmunopedia. Una nueva plataforma en línea para avanzar en la Educación Global en Inmunología.**
Vet. Giselle Ingrata (UBA).

Reporte sobre el simposio de Enseñanza de Inmunología Veterinaria en el marco del “I Simposio Internacional y X Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria” 2017

Gary Entrican, Silvia Mundo, Fabiana Grinsztajn y Eduardo Mortola

El 10 de noviembre de 2017 se llevó a cabo en el evento, un taller especial de educación. El taller contó con la participación de educadores/docentes, estudiantes, representantes de organismos gubernamentales y profesionales de las ciencias veterinarias. Asimismo, estuvo presente el Dr. Gary Entrican como presidente del Comité de Inmunología Veterinaria (VIC) de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) con el propósito de fomentar vínculos con docentes de inmunología veterinaria de América del Sur, en línea con la misión de IUIS-VIC para promover globalmente la educación universitaria en inmunología veterinaria.

La Dra. Silvia Mundo (Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires) y el Dr. Eduardo Mortola (Universidad de La Plata, Buenos Aires) realizaron la presentación inaugural, y brindaron un análisis acotado sobre una encuesta llevada a cabo a los profesores responsables de impartir la asignatura en las Facultades de Veterinaria de Argentina. En el informe, se destacó las áreas específicas del plan de estudios que involucran directamente la inmunología impartida en las 17 Facultades de Veterinaria en Argentina. El 100% de las escuelas enseña inmunología básica, pero solo el 23% enseña inmunología básica y aplicada como áreas definidas en asignaturas dentro del plan de estudio de la carrera. Sin embargo, aún sin cursos definidos, se reconoció que la inmunología aplicada se enseña en otras asignaturas/cursos del plan de estudios. La integración de la enseñanza de inmunología básica y aplicada fue un tema recurrente durante el taller.

Las conclusiones de esta sección del taller incluyen:

- A pesar de contar con agencias de acreditación para la educación superior en Argentina (CONEAU) y Mercosur (ARCUSUR), no existe una equivalencia total entre el plan de estudios de las diferentes escuelas de veterinaria.
- La mayoría de las facultades de veterinaria (80%) propone prácticas de laboratorio en la inmunología enseñada.
- El plan de estudios y la orientación de la inmunología aplicada que se enseña dependen de la formación profesional del plantel docente de cada facultad.
- Desde la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria y a través de estos 10 años se han discutido sobre la enseñanza de la inmunología veterinaria en Argentina y este año se han incluido docentes de otros países como México y el Reino Unido.

El Dr. Francisco D'Alessio del Servicio Nacional de Calidad y Seguridad Agroalimentaria (SENASA) brindó su perspectiva sobre las habilidades y cualidades profesionales que se pretenden de los egresados de veterinaria que ingresan al Servicio Veterinario Argentino. Estas incluyen la capacidad de interpretar literatura, conocimiento en innovación tecnológica, demostración de juicio crítico y liderazgo en vacunas, diagnóstico, epidemiología y producción de alimentos; áreas en las que la inmunología juega un papel trascendental. El Dr. D'Alessio se refirió al código de la OIE y la importancia de adherirse a los estándares nacionales e internacionales en una comunidad cada vez más globalizada. Su charla fue seguida por Dra. Ana Nicola del Centro de Buenos Aires para la Formación de

Servicios Veterinarios (CEBASEV) que también se refirió al documento 2009 de la OIE para Educación Veterinaria y las competencias que se espera que los graduados posean, y que se deberían impulsar en los planes de estudios. Esta sección fue concluida por el Dr. Sebastián Robledo de la Federación Veterinaria Argentina (FeVA) quien reforzó el valor de los graduados de veterinaria con una sólida formación en la ciencia y haciendo hincapié en la importancia de los profesionales en la función social de la extensión universitaria, fundamentalmente en zonas carenciadas del país.

Como hecho muy favorable, pero poco común en este tipo de eventos, se dio la oportunidad de que una estudiante actual de grado manifestara su opinión sobre la enseñanza de la inmunología. La Srta. Carolina Leto, estudiante de veterinaria en la Universidad de Buenos Aires, habló sobre lo que se enseña y lo que se aprende, y cómo los elementos del curso pueden parecer aislados, pero son parte de una estrategia de enseñanza integrada. Esto es particularmente cierto para la inmunología, donde los detalles pueden olvidarse con el tiempo, pero Carolina enfatizó el rol de los maestros en inspirar a los estudiantes y alentar el juicio crítico en la enseñanza de la inmunología, una habilidad que perdura.

El Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, de la Universidad Nacional Autónoma de México, muy involucrado en la enseñanza de la inmunología veterinaria y la ofrece en su Unidad Académica en forma teórica y práctica, con múltiples métodos de evaluación. Brindó una visión general de estos diferentes elementos y mencionó que, para abordar la brecha en la disponibilidad de materiales de enseñanza relevantes, escribió un libro de Inmunología Veterinaria con capítulos específicos de cada especie sobre vacunología escritos por expertos en el tema. El Dr. Pabello también señaló que el momento en que se enseña la inmunología dentro del plan de estudios es muy importante para la comprensión del estudiante (en su caso en el quinto semestre de la carrera). El Dr. Gary Entrican relató sus experiencias de enseñanza desde el punto de vista como miembro de la Academia de Educación Superior. Reforzó muchos de los puntos brindados anteriormente, colocándolos en el contexto de resultados de la enseñanza claramente definidos y objetivos de aprendizaje que están vinculados a las evaluaciones y despejan tanto a los estudiantes como a los educadores. Dio un resumen del taller de enseñanza en IVIS Gold Coast en 2016, donde un tema común fue el valor de los estudios de casos para ayudar a los estudiantes a comprender y recordar la inmunología en un contexto clínico. También habló sobre la continuación de la inmunología veterinaria en el ámbito de postgrado, donde las necesidades y los resultados de aprendizaje pueden ser bastante diferentes de la enseñanza de grado. Destacó el papel que IUIS puede desempeñar en apoyar la educación a través de talleres temáticos y apoyar la asistencia de los estudiantes a las reuniones y conferencias, y señaló las fuentes de información relevantes.

Gary Entrican mencionó “Immunopaedia” brevemente. Esto fue discutido en detalle por Giselle Ingratta (Docente auxiliar de la Universidad de Buenos Aires). Giselle se convirtió en

embajadora de Immunopeadia después de la reunión de ALAI en Medellín en 2015 y discutió el papel de embajador, cómo las personas pueden convertirse en embajadores, y la necesidad particular de estudios de casos para poblar el área veterinaria dentro del sitio web.

El cierre del taller estuvo a cargo de la Esp. Fabiana Grinsztajn, experta en pedagogía de la Universidad de Buenos Aires. Ella habló sobre las regulaciones, la garantía de calidad y los estándares que se esperan de una buena enseñanza. También destacó el valor de las nuevas técnicas y formas de enseñanza, incluidos estudios de casos para promover el pensamiento crítico y producir graduados capaces de tomar decisiones.

Resultados anticipados del taller:

1. Una visión compartida de cómo se puede enseñar inmunología y una mayor conciencia de los recursos de enseñanza a nivel mundial
2. Aumento de las interacciones con Immunopaedia, más embajadores y la provisión de monografías que pueden compartirse
3. Revisar y homologar los contenidos de inmunología que se imparten en las diferentes escuelas de veterinaria de Argentina, y comparar con la escuela en Latinoamérica y Europa.

En síntesis, durante este Taller se ha discutido y trabajado sobre las Competencias profesionales generales y específicas que tributan al perfil del veterinario

considerando que “El Médico Veterinario debe ser un profesional con espíritu ético, crítico, científico y humanista que mejore la calidad de vida del hombre y los animales a través de acciones que permitan la prevención, diagnóstico, resolución de problemas de salud y bienestar animal, producción animal sustentable, calidad e inocuidad de los alimentos y salud pública veterinaria en armonía con el medio ambiente.”

Se ha discutido y coincidido con los participantes del Simposio en que las Competencias Profesionales se componen de conocimientos, habilidades, destrezas, actitudes, aptitudes y valores que el egresado debe poseer y aún desarrollar incluso durante toda su vida a fin de resolver y aportar posibles soluciones sobre: Medicina y Salud Pública, Producción Animal Sustentable, y aquellas consideradas Competencias Transversales: Bienestar Animal, Legislación Veterinaria, Ética y Habilidades de Comunicación.

En todas ellas se enmarca la enseñanza de la Inmunología que se encuentra incluida como conocimientos básicos y aplicados a las competencias específicas del veterinario y que durante su enseñanza –aprendizaje debe ser consciente de aplicar y aportar a la formación de un agente de salud competente para afrontar los nuevos y cada vez más vertiginosos desafíos.

Inmunopedia. Una nueva plataforma en línea para avanzar en la Educación Global en Inmunología

Ingratta GG.¹, Mundo SL.¹, Bonamy Holtak², Thandeka Moyo², Maxwell Chan^{2,3}, Rebecca Ng's^{1,2},
Michelle Letarte³, Clive M. Gray²

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Inmunología. Buenos Aires, Argentina.

² Universidad de Ciudad del Cabo, División de Inmunología, Sudáfrica.

³ Universidad de Toronto, Canadá.

*giselle.ingratta@gmail.com

Immunopaedia.org es un sitio web de inmunología, de acceso abierto, dirigido a investigadores, profesionales de la salud y estudiantes. La misión del sitio es promover el conocimiento y la investigación en el campo de la inmunología en todo el mundo. Inmunopedia es el sitio web oficial de recursos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS). Con más de 1 millón de visitas en el último año, Inmunopedia se ha convertido en un recurso novedoso para acceder a material educativo, relacionado con la inmunología a nivel internacional. Desde su creación, el sitio se ha expandido para convertirse en un recurso más amplio de conocimiento inmunológico y estudios clínicos, cubriendo todo el sistema inmunológico, su función y cómo se interrumpe durante la enfermedad. En el año 2017, la Fundación de Inmunopedia

lanzó el programa Embajadores creando una red de ex becarios del IUIS. Estos profesionales de carrera temprana apoyan Inmunopedia, ampliando la red global de inmunología y son responsables de representar y promover el sitio web en sus países de origen e instituciones. En la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA consideramos importante la inclusión de nuevas herramientas que fomenten tanto la enseñanza como el aprendizaje de la materia. El aporte de actualizaciones en el campo de la inmunología, así como también la utilización de sitios web para promover la educación, se espera que puedan formar parte de las nuevas estrategias de transmisión de conocimientos a los alumnos.

Resúmenes de los Trabajos presentados en las X Jornadas

ÁREAS TEMÁTICAS

SESIÓN 1	VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS	Resúmenes N° 01 - 15
SESIÓN 2	ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS E INMUNIDAD FRENTE A INFECCIONES	Resúmenes N° 16 – 32
SESIÓN 3	INMUNOINTERVENCIÓN	Resúmenes N° 33 - 52
SESIÓN 4	DOCENCIA	Resúmenes N° 53 - 59
SESIÓN ESPECIAL	Presentación oral del trabajo premiado: Caracterización de péptidos de proteínas implicadas en la invasión de <i>B. bovis</i> a los eritrocitos que generan inmunidad neutralizante y memoria de larga duración. Mosqueda J.; Hidalgo-Ruiz M.; Mejía-López S.; Suarez C.; Pérez-Serrano RM; Zaldívar-Lelo de Larrea G.	

PÓSTERS

SESIÓN 1: VACUNAS E INMUNOPROFILAXIS

1- El uso de cajas lipídicas y QuilA en vacuna contra el Virus de la Fiebre Aftosa aumenta la inmunidad humoral y celular; favoreciendo la protección inducida frente al desafío viral

Bidart, J^{1,2}; Gammella, M¹; Kornuta, C^{1,2}; Soria, I^{1,2}; Langellotti, C^{1,2}; Mongini, C^{1,2}; Calvino, L³; Quattrocchi, V¹; Marcipar, I^{2,4}; Zamorano, P^{1,2}

¹ Instituto de Virología-CICVyA, INTA, Hurlingham, Argentina;

² CONICET, CABA, Argentina;

³ EEA Rafaela, INTA, Rafaela, Argentina;

⁴ Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

bidart.juan@inta.gob.ar

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa y económicamente importante que afecta a animales de pezuña hendida. Las vacunas comerciales formuladas con Virus de Fiebre Aftosa inactivo (VFAi) y adyuvantes son eficaces, sin embargo se busca utilizar un adyuvante de origen nacional que resulte también eficaz y económico. Las cajas lipídicas y QuilA (ISPA - Immunostimulant Particle) son un adyuvante tipo ISCOM. Los ISCOM (del inglés Immune Stimulating Complexes) son partículas esféricas con forma de aproximadamente 40 nm de diámetro, compuestas por saponina, colesterol y fosfolípidos, estas partículas pueden retener al antígeno mediante interacciones hidrofóbicas. El adyuvante ISPA contiene liposomas formulados con dipalmitoil-fosfatidilcolina, colesterol, esteralamina, cargado con QuilA y es de origen nacional. En este trabajo se evaluó si el ISPA potencia la respuesta inmune contra VFA serotipo A2001. Se utilizó el modelo murino que predice la calidad de vacunas contra FA en bovinos. Se inmunizaron ratones BALB/c (n= 5 por grupo) con (I) VFAi; (II) VFAi-ISPA (5µg); (III) VFAi-ISPA (10µg); (IV) ISPA y (V) PBS controles negativo. El VFAi utilizado en las vacunas fue de 0,3 µg/dosis en todos los casos. Los grupos I y II fueron inmunizados los días 0 y 14, y desafiados a 28 dpv. Los grupos I y III fueron inmunizados el día 0 y desafiados a 21 dpv. Se escogió 0,3 µg/dosis de VFAi porque, a los 21 dpv, induce protección en el 40% de los animales vacunados y desafiados con virus. A los 28 dpv, en el grupo II: VFAi-ISPA (5µg) (con booster a 14 dpv), el 100% de los animales estuvo protegido frente al desafío viral, en el grupo: VFAi el 80%. Al momento del desafío, los Acs totales áVFA fueron: 6,2±0,1 en el grupo VFAi-ISPA, mayores (p<0,001) que el grupo VFAi (4,6±0,4). Los Acs medidos por Elisa en fase líquida contra VFA,

mostraron una diferencia significativa en el grupo VFAi-ISPA (p<0,01) en comparación con los animales vacunados con VFAi (3,08±0,02; y 1,8±0,7 respectivamente). La avidéz de los sueros en los grupos: VFAi-ISPA fue significativamente superior al grupo VFAi (p<0,05). Cuando se estudiaron los isotipos inducidos (28 dpv), se encontró un incremento significativo de IgG1, IgG2a e IgG2b en el grupo VFAi-ISPA con respecto a los ratones que recibieron VFAi. A los 21 dpv, en el grupo VFAi-ISPA (10 µg) sin booster, los Acs totales áVFA, medido por Elisa sandwich, fue de: 5,06±0,07 significativamente mayor a los niveles detectados en los ratones vacunados con VFAi (p<0,05) y vacuna comercial (4,62±0,02). Los animales vacunados con VFAi-ISPA (10 µg) y vacuna comercial estuvieron protegidos frente al desafío viral (100%) mientras que en el grupo VFAi solo el 40%. Los isotipos inducidos en el grupo VFAi-ISPA (10µg) fueron similares a los detectados a los 28 dpv en los animales que recibieron vacunación y booster con VFAi-ISPA (5µg). En la evaluación de inmunidad celular, a los 21 dpv, se realizó una linfoproliferación utilizando esplenocitos (marcación con CFSE). Cuando los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con VFAi, se detectó mayor proliferación en el grupo VFAi-ISPA (10µg) en comparación con los animales vacunados con: VFAi, ISPA o PBS (p<0,05), no encontrándose diferencias significativas con las generadas por la vacuna comercial. Asimismo, datos preliminares indican un leve aumento en la población CD4+/IFNγ+ en los animales vacunados con VFAi-ISPA (10 µg) y vacuna comercial en relación a los vacunados con VFAi, evaluado por citometría de flujo. La inclusión de cajas lipídicas y QuilA en una vacuna experimental contra FA indujo un incremento en la inmunidad humoral y celular. También se observó una mayor protección frente al desafío viral.

2- Caracterización *in vitro* del aislamiento NC-Argentina LP1 de *Neospora caninum* ¿potencial candidato vacunal?

Campero, L.M.^{1,2*}; Dellarupe, A.^{1,2}; Rambeaud, M.^{1,2}; Unzaga, J.M.¹; Moré, G.A.^{1,2}; Venturini, M.C.¹

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Cs. Veterinarias, UNLP.2CONICET

*luciacampero86@gmail.com

Neospora caninum es un protozoo de vida intracelular obligado, responsable de abortos en los bovinos. Dado que no existen tratamientos y/o vacunas para controlar la enfermedad, es necesario conocer las características biológicas de nuevos aislamientos, para seleccionar potenciales candidatos vacunales. En Argentina se obtuvo el primer aislamiento de origen bovino a partir del cerebro de un ternero asintomático congénitamente infectado que se denominó NC-Argentina LP1. El objetivo del presente trabajo fue determinar la virulencia del mismo en un modelo *in vitro* evaluando la tasa de invasión mediante el uso de anticuerpos monoclonales (MonAb) dirigidos hacia antígeno de superficie 1 (NC-SAG1) específico del estadio del taquizoito de *N. caninum*. Se realizaron 3 ensayos independientes; en cada uno se utilizaron 2 placas de 24 pocillos con cubreobjetos redondos de 15 mm y se sembraron 105 células VERO/pocillo. Una vez formada la monocapa, se infectó con 104 taquizoítos purificados/pocillo del aislamiento NC-Argentina LP1 por triplicado. Se incluyeron 3 pocillos con similar dosis de taquizoítos de NC-Spain 7, como aislamiento de referencia de alta virulencia y 3 pocillos sin infectar como control negativo. Una de las placas se lavó a las 4 h post-infección (pi) para eliminar los taquizoítos que no invadieron hasta ese momento, mientras que la otra placa no se lavó. Los datos obtenidos se utilizaron para evaluar la capacidad de invasión de los taquizoítos antes y después de las 4 h pi. Se incubaron las placas en estufa durante 48 h pi. Se cuantificó la tasa de invasión marcando a los taquizoítos con los MonAb anti-SAG1 y se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, EE.UU.). Los núcleos de las células se tiñeron con el colorante nuclear DAPI (DAPI Nuclei Acid Stain, Molecular Probes, Invitrogen). Los cubreobjetos

se montaron sobre un portaobjeto y se observaron con microscopio de epifluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania). Cada nueva vacuola parasitófora (VP) o placa de lisis (PL) se interpretó como un taquizoito que invadió y multiplicó. Se definió a la tasa de invasión (TI) como el número de eventos (VP o PL) por pocillo a las 4 h (TI4hs.) y 48 h pi (TI48hs.). Las diferencias entre las TI4hs. y TI48hs. de NC-Argentina LP1 y NC-Spain 7 se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney con un nivel de confianza de 95%, usando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se observaron diferencias significativas en las TI4hs. y TI48hs. para ambos aislamientos, siendo identificadas mayoritariamente VP en los dos tiempos. Para el aislamiento NC-Argentina LP1 se registraron las siguientes TI (promedio): TI4hs.=699 y TI48hs.= 1700 ($p < 0,0001$) y para el aislamiento NC-Spain 7: TI4hs.=1182 y TI48hs.= 2077 ($p < 0,0001$). Cuando se compararon las TI de los 2 aislamientos a las 4 h ($p = 0,0006$) y 48 h ($p = 0,0106$) se detectaron diferencias significativas. Las TI de NC-Argentina LP1 fueron inferiores a las TI registradas para NC-Spain 7. Estos resultados permiten concluir que el aislamiento NC-Argentina LP1 posee una reducida virulencia respecto a la cepa de referencia. Por otro lado, también indicarían que los taquizoítos no pierden la capacidad de invasión tras 4 h pi dado que el promedio de TI48 hs. es superior al promedio de TI 4hs. Si bien es necesario complementar con estudios de proliferación *in vitro* y evaluar la patogenicidad del aislamiento en modelos *in vivo*, los resultados del presente trabajo son alentadores y permiten proponer al aislamiento local NC-Argentina LP1 como posible candidato vacunal para el diseño de vacunas de reducida virulencia.

3- Evaluación de la respuesta inmune humoral utilizando anfifilos aminoacídicos como adyuvantes en la formulación de vacunas a subunidades

Grippo, L^{1,2*}; Reidel, IG¹; De Zan, MM³; Müller, DM²; Veaute C¹.

¹ Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

² Laboratorio de Química Aplicada (LAQUIMAP), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

³ Laboratorio de Control de Medicamentos, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

* grippolucia@gmail.com

El diseño básico de un anfifilo aminoacídico tipo *gemini* comprende un par de cadenas hidrofóbicas de igual longitud formadas por ácidos grasos naturales y una región polar, catiónica, derivada de oligopéptidos, carbohidratos, espermina, entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad adyuvante de estos compuestos y el agregado de oligodesoxinucleótidos CpG (CpG) como inmunoestimulantes. En una primera instancia, se evaluaron formulaciones compuestas por 3 anfifilos *gemini* (G1; G2 y G3) con diferentes secuencias de aminoácidos y distinta longitud en las cadenas hidrofóbicas. Estos fueron formulados conteniendo Albúmina Sérica Bovina (BSA, 100µg/mL), con y sin agregado de CpG (7,5nmol/mL), siendo así los grupos experimentales: G1+BSA, G2+BSA, G3+BSA, G1+BSA+CpG, G2+BSA+CpG y G3+BSA+CpG. Como controles se utilizaron los grupos: G1+CpG, G2+CpG, G3+CpG e hidróxido de aluminio (Al (OH)3), como adyuvante modelo, +BSA. En una segunda instancia, en base a los resultados obtenidos para los distintos *gemini*, se escogió uno de ellos para la evaluación de la disminución de dosis de este compuesto ensayándose las formulaciones: G2-60µM+BSA+CpG, G2-200µM+BSA+CpG y G2-400µM+BSA+CpG y los respectivos grupos controles: G2-60µM, G2-200µM y G2-400µM. En ambos ensayos la respuesta inmune se evaluó inoculando ratones Balb/c con 3 dosis de 10 µg de BSA por vía subcutánea, cada 3 semanas. Los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a se evaluaron por ELISA indirecto en sueros diluidos 1/100. Ningún animal presentó anticuerpos anti-BSA previos a las inmunizaciones ni en los grupos controles a lo largo de todo el protocolo. Luego de la primer y segunda dosis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y sus respectivos controles, mientras que el grupo Al(OH)3+BSA generó altos niveles de IgG desde la primer dosis. Luego de la tercera dosis, si bien ningún grupo alcanzó los niveles de IgG del grupo Al(OH)3+BSA, se pudo observar que los grupos G2+BSA+CpG y G3+BSA+CpG superaron

significativamente a sus controles ($p < 0,05$). Los isotipos, IgG1 e IgG2a, se analizaron sobre las muestras obtenidas luego de la tercera dosis. Respecto a la producción de IgG1, se encontraron diferencias significativas solo en los grupos G2+BSA y G2+BSA+CpG respecto a su grupo control ($p < 0,05$), mientras que la producción de IgG2a se vio significativamente aumentada en los grupos G1+BSA+CpG, G2+BSA+CpG y G3+BSA+CpG, respecto a sus controles, mientras que las primeras dos formulaciones también superaron significativamente a los grupos G1+BSA y G2+BSA ($p < 0,05$). En base a estos resultados se escogió el *gemini* G2 para continuar su estudio en una segunda etapa. Sólo luego de la tercer dosis se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgG alcanzados por los grupos G2-60µM+BSA+CpG y G2-400µM+BSA+CpG respecto a sus controles ($p < 0,05$, $p < 0,001$; respectivamente). Respecto al análisis de subtipos luego de la tercer dosis, la producción de IgG1 se vio aumentada significativamente en los grupos G2-200µM+BSA+CpG y G2-400µM+BSA+CpG respecto a sus controles ($p < 0,05$), sin encontrarse diferencias entre los grupos experimentales. Por otro lado la producción de IgG2a, si bien sólo fue significativamente mayor a su control para el grupo G2-200µM+BSA+CpG ($p < 0,05$), el grupo G2-400µM+BSA+CpG indujo niveles similares al anterior aunque no estadísticamente significativos. Los resultados demuestran que los compuestos *gemini* ensayados son capaces de inducir una respuesta inmune humoral al estar asociados a un CpG, resaltando el mejor desempeño de G2 posiblemente debido a sus características estructurales. Si bien estadísticamente no se encontró una asociación entre la concentración de G2 y la respuesta inmune humoral, se puede observar una tendencia al aumento de IgG conforme aumenta la concentración del lipopéptido. Cabe destacar la producción de IgG2a y así la posibilidad de orientar el perfil de respuesta con el agregado del CpG.

4- Evaluación de la inmunogenicidad de moléculas sintéticas, candidatas a una vacuna contra el Virus de la Anemia Infecciosa Equina, en ratones

Herzfeld Jael^{1,2}, Gervé Paula^{1,2}, Colombero Magali¹, Ricotti Sonia², García Lucila³, Veaute Carolina², Soutullo Adriana^{1,2}.

¹ Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias. Sub-Dirección de Sanidad Animal. Ministerio de la Producción. Gobierno de la Provincia de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

² Cátedra de Inmunología Básica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

³ Cátedra de Biología Celular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Correo electrónico: jael.h@gmail.com

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) es un Retrovirus del género *Lentivirus*, que afecta a la familia *Equidae*. Su genoma cuenta con dos moléculas de RNA simple hebra. El gen Env codifica a las dos glicoproteínas de la envoltura: gp90 y gp45. Ambas presentan segmentos conservados y variables alternados. Durante las sucesivas replications del virus, dichas regiones variables sufren mutaciones, por lo que hasta el momento no se ha desarrollado una vacuna efectiva que logre la protección frente a las diferentes cuasiespecies virales que coexisten. En diversos estudios se ha observado la capacidad de las proteínas de superficie (gp90) y de transmembrana (gp45) de inducir una fuerte respuesta inmunológica. En el presente trabajo se buscará evaluar la inmunogenicidad de dos péptidos sintéticos, en especie murina, que representan regiones conservadas de estas glicoproteínas de modo de analizar su inclusión, a futuro, en una vacuna contra el VAIE. Dos grupos de ratones (n=7) Balb/c, hembras de 2 meses de edad, fueron inoculados 7 veces, por vía subcutánea, cada 15 días con 100 ug de cada péptido sintético por animal, gp90B(351-447) ó de gp45B(1951-2010) emulsionados en Adyuvante Completo de Freund (ACF) para la primera inoculación, y Adyuvante Incompleto de Freud (AIF) para las subsiguientes. El grupo control (n=6) se inoculó solo con RPMI-ACF/AIF, como se mencionó anteriormente. Se extrajeron muestras séricas a los días 0, 46, 62, 76 y al momento de sacrificio, día 84, en el cual también se obtuvieron las células mononucleares esplénicas. Se analizó la presencia de anticuerpos anti gp90B y gp45B, y de IL-12 en los sueros murinos por ELISA y se realizaron ensayos de linfoproliferación frente a los péptidos con las células

mononucleares esplénicas, mediante la detección por ELISA de la BrdU incorporada a los linfocitos en proliferación. Los resultados obtenidos indican que los péptidos gp90B y gp45B inoculados han logrado desencadenar una respuesta inmune humoral y celular. En efecto, al comparar los niveles de anticuerpos de los ratones inoculados con ambos péptidos con el grupo control, se encontraron valores significativamente superiores ($0.0001 < p < 0.0019$), siendo el péptido gp45B más inmunógeno que el péptido gp90B ($p < 0.035$), igualándose en el día 84. Diferencias menores pero significativas ($p < 0.05$) también se evidenciaron al analizar los índices de proliferación. Por otra parte, 4/5 animales del grupo gp90B y 5/7 del grupo gp45B, dieron índices mayores a 2. Al comparar las concentraciones de IL-12 (día 84) de los sueros de los grupos inoculados con ambos péptidos con el grupo control ($p > 0.2$) no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas, mientras que sí lo hubo con los valores obtenidos a partir de los sueros pre-inmunes ($0.0003 < p < 0.0124$). Si bien podemos confirmar el carácter inmunogénico de ambos péptidos, no tenemos certeza que la respuesta inmune celular pueda estar asociada a la producción de IL-12. En efecto, la mayor producción de IL-12 respecto de los valores iniciales pre inmune puede estar asociada tanto al adyuvante como a los péptidos inoculados. A partir del presente trabajo se ha demostrado que ambos péptidos sintéticos, gp90B y gp45B, son inmunogénicos en especie murina, pudiendo ser potenciales candidatos vacunales. Estudios complementarios permitirán analizar la capacidad de estos péptidos de inducir una respuesta citotóxica asociada al perfil Th1.

5- Análisis de la respuesta inmunitaria postvacunación para campylobacteriosis genital bovina

Lahore, R¹; Chiapparrone, M.L.²; Melucci, O¹; Rodríguez, E²; Catena, M²

1Méd. Vet. 2SAMP. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Tandil.

*mcatena@vet.unicen.edu.ar

La campylobacteriosis genital bovina es una enfermedad reproductiva presente en los rodeos bovinos de Argentina, se caracteriza por afectar el porcentaje de destete, disminuir los índices productivos y causar pérdidas económicas a los productores ganaderos. Es escasa la información existente sobre el desempeño de las vacunas contra *Campylobacter fetus* en condiciones de ganadería extensiva. El objetivo fue evaluar la dinámica de anticuerpos vacunales luego de la aplicación de dos productos biológicos comerciales. En un ensayo a campo, se inmunizaron por vía sistémica 30 hembras bovinas Aberdeen Angus divididas al azar en 3 grupos experimentales de 10 animales cada uno: grupos P, M y C. Se utilizaron dos vacunas comerciales inactivadas, una polivalente compuesta por *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis* y otra combinada, con ambas subespecies de *Campylobacter fetus* y otros patógenos reproductivos. El grupo P fue tratado con la vacuna polivalente, el grupo M con la vacuna combinada y el grupo C sin vacunar. Ambos inmunógenos se administraron al preservicio, en dos dosis con 21 días de intervalo, tal como lo indica el laboratorio. Se realizó un servicio estacionado de tres meses por monta natural con toros negativos a brucelosis, campylobacteriosis y tritricomoniasis. A los días 0, 30, 60, 90 y 120 se tomaron muestras de suero y mucus cérvico vaginal (MCV). El día 0 se determinó el estado inmunitario anti *Campylobacter fetus* objeto de evaluación de eficiencia vacunal y se aplicó la primera dosis de vacuna. Las titulaciones de IgA en MCV y de IgG e IgA sérica se realizaron mediante un ELISA indirecto (antígeno: célula entera de *Campylobacter fetus*). Los resultados fueron expresados en DO con un valor de corte 0,46 fijado a partir de los sueros negativos (promedio + 2SD). Para evaluar la respuesta se realizó análisis de varianza para medidas repetidas bajo un modelo que contempló el efecto grupo y la medición repetida con una estructura autoregresiva de

primer orden. El porcentaje de preñez fue mayor en los grupos vacunados (100%) respecto al control (80%). Las bacterinas fueron capaces de inducir una respuesta inmune humoral y local. La respuesta de IgG en suero entre los 30 y 60 días, fue significativamente mayor en los animales del grupo P ($p < 0,0001$ y $p = 0,0036$ respectivamente), sin diferencias entre los grupos M y C. A partir del día 90 no se observaron diferencias en los niveles de IgG para todos los grupos ($p > 0,05$). La dinámica de IgG en MCV no presentó efecto de grupo ($p = 0,5123$). A los 90 y hasta el día 120 se observó una mayor respuesta en los grupos M y P ($p < 0,0001$). Con respecto a la IgA en MCV, no hubo efecto de grupo ($p = 0,9975$). A partir del día 60 se registró un aumento respecto a los valores iniciales, con diferencias significativas a partir de los 90 y hasta el día 120 en los grupos P y M ($p < 0,001$). Cuando se analizó el comportamiento de la IgG intragrupo P, los resultados mostraron una mayor respuesta de anticuerpos hasta el día 60 en suero y a partir del día 90 en MCV ($p < 0,001$). La respuesta de IgG en suero para el grupo M fue baja durante todo el ensayo al igual que en MCV, con aumento a partir de 90 y posterior descenso al día 120. Las hembras inmunizadas con *Campylobacter fetus fetus* tuvieron un patrón de respuesta humoral similar al descrito por Catena (2002) para las infecciones naturales, si bien la respuesta en hembras inmunizadas fue más temprana. La inmunización incrementó los niveles de IgG séricos y genitales e IgA genital. La dinámica de la respuesta inmune permite inferir que la vacunación podría utilizarse de forma más eficaz, al adelantar la fecha de inmunización a los 60 y 40 días preservicio. De esta manera, se lograrían mayores niveles de anticuerpos en MCV que permitirían reducir la infección e incluso, evitar la colonización de *Campylobacter fetus* desde el inicio del servicio.

6- Respuesta inmune humoral de memoria hacia antígenos recombinantes de *Staphylococcus aureus* formulados con liposomas y odn-cpg en vaquillonas primíparas

Reidel, I.G.^{1*}; Suarez Archilla, G.²; Calvinho, L.²; Camussone, C.²; Veaute C¹.

¹ Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

² Estación Experimental Agropecuaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina.

*ireidel@fcb.unl.edu.ar

La mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* causa importantes pérdidas económicas al productor y la industria láctea en Argentina. Hasta la fecha, el control se basa en higiene durante el ordeño, terapia antibiótica y descarte de animales infectados. Nuestro grupo ha desarrollado una vacuna a subunidades para su control, formulada con un adyuvante capaz de incrementar, dirigir y sostener la respuesta inmune. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la administración combinada de antígenos de *S. aureus* recombinantes y liposomas, con o sin oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG) como inmunoestimulantes, en la inducción de la respuesta inmune humoral de memoria. Los liposomas se obtuvieron a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol y estearilamina (7:2:2 molar) por el método de Inyección Etanólica. Los antígenos evaluados fueron la proteína de unión a fibronectina (FnBP) y el factor de aglutinación (Cif) recombinantes, con o sin ODN-CpG (7,5 µM). En una primera instancia, se inmunizaron terneras de 6 a 8 meses de edad por vía subcutánea con 3 dosis de 200 µg de proteína, a los 0, 15 y 45 días. Un año más tarde recibieron un refuerzo por la misma vía y un segundo refuerzo por vía supramamaria pasados 6-9 meses, correspondientes a 15-25 días previos al primer parto. Los antígenos se formularon con liposomas (Lip), ODN-CpG, Lip+ODN-CpG, o hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). Los grupos control recibieron Al(OH)₃ o Lip+ODN-CpG sin proteínas. Se tomaron muestras de sangre durante todo el protocolo y muestras de leche de los cuatro cuartos, a los días 30 y 45 pos refuerzo preparto (aproximadamente 10 y 25 días de lactancia, respectivamente). Los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 anti-FnBP y anti-Cif, se evaluaron mediante ELISA indirecto; en sueros diluidos 1:2000 y en leches diluidas 1:100. Ningún animal presentó anticuerpos anti-*S. aureus* anteriores al estudio. En los grupos control no se indujo respuesta humoral específica hacia los antígenos evaluados a lo largo de todo el protocolo. Si bien dentro de las

primeras 3 dosis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Lip+FnBP/Cif+ODN-CpG y Al(OH)₃+FnBP/Cif, ambos generaron niveles de IgG superiores a los grupos Lip+FnBP/Cif u ODN-CpG+FnBP/Cif ($p < 0,001$). Luego del refuerzo anual la formulación Lip+FnBP/Cif+ODN-CpG generó un incremento rápido y significativo de IgG en sangre respecto a su grupo control ($p < 0,001$) que se mantuvo incluso hasta el día 60 pos refuerzo. En este punto no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo Al(OH)₃+FnBP/Cif. Una vez realizado el refuerzo preparto los niveles de IgG específicas para ambas proteínas, en sangre, generados por la formulación Lip+FnBP/Cif+ODN-CpG aumentaron significativamente respecto a los grupos Lip+ODN-CpG y ODN-CpG+FnBP/Cif ($p < 0,001$; $p < 0,01$, respectivamente). La producción de IgG1 estuvo estimulada en todos los grupos experimentales sin diferencias significativas entre ellos, mientras que sólo en el grupo Lip+FnBP/Cif+ODN-CpG se encontraron animales que produjeron IgG2 específica para ambas proteínas. Respecto a las muestras de leche, se encontraron IgG específicas para ambas proteínas en todos los grupos experimentales, sin diferencias significativas entre ellas. En relación a los subtipos sólo se encontraron niveles elevados de IgG1 en el grupo Lip+FnBP/Cif+ODN-CpG ($p < 0,05$ respecto al grupo control), mientras que no fue posible detectar la presencia de IgG2. Los resultados muestran que la administración combinada de liposomas y ODN-CpG es capaz de inducir una respuesta humoral con altos niveles de anticuerpos, hacia antígenos recombinantes. También se demostró que fue posible generar una respuesta humoral de memoria, 2 años después del esquema de inmunización inicial, en vaquillonas primíparas. Cabe destacar la producción de IgG2 y presencia de anticuerpos en leche, utilizando un único refuerzo preparto, periodo considerado de máxima susceptibilidad a infecciones intramamarias.

7- Estudio retrospectivo sobre el uso de vacunas contra Parvovirus y Leptospirosis Porcina en granjas del sur de Córdoba

Mayon, M.^{1*}, Carranza, A.¹, Parada, J.¹, Ambrogi, R.¹, Di Cola, G.¹

¹ Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, 601 km. Río Cuarto, Córdoba.

*Martin Mayon. *mayonm20@gmail.com

La parvovirus y la leptospirosis son enfermedades que ocasionan trastornos reproductivos en cerdos, que se caracterizan por producir camadas a término con alto porcentaje de lechones momificados, y hasta abortos, y leptospirosis es también una importante zoonosis. Su control se basa en el uso de un estricto plan de vacunación a cachorras, cerdas multíparas y padrillos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de vacunas contra estas patologías en granjas del sur de Córdoba. Para esto, se analizaron 61 encuestas realizadas a productores porcinos con más de 30 madres y el muestreo fue por conveniencia. El cuestionario constaba de preguntas cerradas y fue realizado por alumnos de 4° año de la carrera de Medicina Veterinaria de la UNRC, durante los años 2010, 2014, 2015 y 2016. En forma general, se observó que el 77,1% de las granjas aplicaban la vacuna contra parvovirus y leptospirosis (P-L). Sin discriminar por sistema productivo, la proporción de granjas que aplicaban la vacuna contra P-L aumentó, desde 2010 (85%) al 2014 (100%). Este último representa el máximo valor registrado de granjas que utilizan esta herramienta (inmunizadas) en todo el periodo analizado, ya que luego disminuyó en 2015 (67%), y más aún en 2016, donde el 63,33% de granjas reportó vacunar contra P-L. En granjas que producen bajo un sistema confinado, se observó que el total de las granjas se encontraban inmunizadas durante periodo 2010 a 2015, detectando una disminución del 25% en el periodo 2015 y 2016. En granjas que producen

bajo un sistema mixto o al aire libre, pudo detectarse una disminución desde 2010 (73%) al 2014 (60%), que aumentó de manera constante hasta el 2016, alcanzando el 87,7% de vacunación contra P-L. Debe considerarse que la práctica de vacunación es muy importante, a pesar de inmunizar el 100% de las madres, queda una subpoblación seronegativa vulnerable. En nuestro estudio se evidencia, a pesar de la tecnología y disponibilidad de recursos con los que cuentan las granjas en un sistema confinado, se aplica cada vez menos la vacuna contra P-L. Respecto a esta disminución en vacunar, se podría asociar a que al momento de recortar gastos, los productores lo hacen con este insumo sanitario, lo que sería contraproducente para la sustentabilidad, la salud, la producción, con impacto económico negativo de la granja. Como contraste, las granjas que producen bajo un sistema mixto o al aire libre, a pesar de tener menor tecnología y disponibilidad de recursos, aplican cada vez más la vacunación contra P-L. Estos de sistemas utilizan la aplicación de la vacuna contra P-L, como una medida preventiva que podría incrementar la productividad y rendimiento económico. Si bien este es un estudio descriptivo con un número acotado de granjas, creemos que el análisis general daría una idea de la realidad de los sistemas productivos y sería el punto de partida para futuras evaluaciones y propuestas sanitarias para el sector porcino.

8- Uso de diferentes liposomas para el mejoramiento de vacunas contra el virus de la fiebre aftosa (serotipo o1campos)

Gammella M¹, Bidart J², Langellotti C^{1,2}, Pappalardo S³, Angeletti P¹, Torales F¹, Calvinho L⁴, Marcipar I^{2,5}, Zamorano P^{1,2}, Quattrocchi V¹.

¹ Instituto de Virología, CICVyA, INTA, Buenos Aires, Argentina

² CONICET, Buenos Aires, Argentina

³ E.E.A- Bariloche INTA, Río Negro, Argentina

⁴ E.E.A-Rafaela INTA, Santa Fe, Argentina

⁵ Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

La Fiebre Aftosa es una enfermedad viral altamente contagiosa y de gran importancia económica, que afecta animales biungulados. Esta enfermedad es causada por el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) y es controlada, principalmente, por medio de la vacunación. Las vacunas utilizadas actualmente contienen la forma inactivada del virus (iVFA) junto a un adyuvante comercial importado, incrementando el costo de la misma. Por tal motivo es que se decide evaluar otros adyuvantes de categoría nacional, buscando así una mayor eficiencia y un menor costo. Los Liposomas son nanopartículas lipídicas que permiten mejorar la respuesta humoral y celular. Los liposomas utilizados en el presente trabajo son el ISPA (Immune Stimulant Particle) desarrollado por los Dres. I. Marcipar (Universidad Nacional del Litoral) y L. Calvinho (INTA- Rafaela). Está preparado a base de fosfolípidos, colesterol, esteralamina y cargado con QuilA; y los liposomas Man- α y Man- α + MLA, desarrollados por el Dr. S. Pappalardo (INTA Bariloche) ambos están formulados a base de Fosfatidilcolina, colesterol, DOTAP, y man- α y uno de ellos cuenta con el agregado de Monofosforil Lípido A (MLA). Estos liposomas poseen una molécula sintética derivada de 2 α -manobiosa (Man α 1-2Man-PEG-PE), que permite direccionar de manera específica, antígenos hacia receptores de membrana DC-SIGN presentes en las células dendríticas. Ambos tipos de liposomas, ISPA y man- α , han demostrado ser efectivos para mejorar la inmunidad contra otros patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Streptococcus uberis* y *Brucella ovis*. El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad inmunogénica que estos liposomas podrían conferirle a la vacuna contra VFA y caracterizar la respuesta inmune desarrollada por los mismos. Debido a las complicaciones prácticas y económicas de trabajar con animales grandes, el modelo de ratón ha sido muy utilizado para el estudio de esta enfermedad y a pesar de

las diferencias en cuanto a infección y patogenia se han encontrado numerosos paralelismos entre este modelo y los hospedadores naturales. Para un primer estudio de la acción de los liposomas, se inmunizaron ratones BALB/c con las diferentes formulaciones liposomales con el fin de caracterizar las poblaciones celulares que son activadas/reclutadas 18h post-vacunación. Para ello, luego de la vacunación intraperitoneal de los liposomas, se recolectaron las células de Lavado Peritoneal, Ganglios mesentéricos y Bazo. Estas fueron marcadas con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos y dirigidos a marcadores de poblaciones celulares para identificar neutrófilos, monocitos, linfocitos B y linfocitos T colaboradores por citometría de flujo. Se observó que el liposoma ISPA incrementa los neutrófilos tanto en cavidad peritoneal como en bazo, indicando la inducción de una respuesta inflamatoria tanto local como sistémica. Los liposomas Man- α y Man- α +MLA, en cambio, incrementan los monocitos tanto en cavidad peritoneal como en ganglios mesentéricos, indicando la producción de una respuesta local sin inflamación, pero con reclutamiento de células fagocíticas. Para evaluar la respuesta protectora en el modelo murino, se comenzó poniendo a punto la cantidad de iVFA necesaria a incluir en las vacunas. Para ello se realizó una curva dosis-respuesta, inoculando los ratones con virus inactivo en diferentes dosis y desafiándolos con virus infeccioso a los 21 días post vacunación (dpv). La dosis que protegió al 20% de los animales resultó ser de 0.1 ug de virus y fue la dosis seleccionada para formular las vacunas. En un ensayo preliminar de vacunación y desafío utilizando el liposoma ISPA formulado con 0.1ug de iVFA, se pudo observar que este liposoma incrementa la respuesta humoral y la protección respecto del iVFA.

9- Protocolo alternativo basado en la inmunización con veneno de *Bothrops diporus* enriquecido con fosfolipasa A2

Nuñez, S.^{1*}; Bustillo, S.²; Maruñak, S¹; Garcia Denegri, M¹.; Leiva, L.².

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Inmunología. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

² Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura, LabInPro (Laboratorio de Investigación de Proteínas). Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina

*sandrasalta@hotmail.com.

A la fecha, el suero antiofídico resulta ser el único tratamiento específico y apropiado para atender la intoxicación por mordedura de serpiente. En el NEA las especies principalmente causantes de estos accidentes son aquellas del género *Bothrops*, en particular *B. diporus* (yarára chica). Entre los componentes tóxicos comúnmente asociados al envenenamiento por ofidios del género *Bothrops* se incluyen enzimas tales como metaloproteasas, fosfolipasas, serinoproteinasas, aminoácidos oxidasas, nucleotidasas, y entre las proteínas no enzimáticas se encuentran, entre otras, desintegrinas y proteínas similares a lectinas que interfieren principalmente en la homeostasia. Integrantes de nuestro equipo de investigación, se logró determinar la composición del veneno de *Bothrops diporus*, conocida como yarára chica. Estudios previos pusieron en evidencia que la respuesta inmune del equino frente a las distintas toxinas del veneno fue variable, posiblemente debido a su capacidad inmunogénica como también por su abundancia relativa en la composición del veneno total. Durante el periodo de inmunización, algunas antitoxinas alcanzaron un título sensiblemente mayor que otras, siendo la fosfolipasa A2 (PLA2) la toxina que induce menor respuesta en el sistema inmune del equino. El objetivo planteado en este trabajo consistió en utilizar un protocolo de inmunización alternativo, basado en el empleo de inóculos de veneno enriquecidos en PLA2 a fin de estimular la producción de antitoxinas mediante el empleo de veneno de *B. diporus* enriquecido con PLA2 aislada a partir del mismo veneno, y compararlo con la respuesta generada por equinos que recibieron protocolo convencional. El plan de inmunización consistió en un total de 12 vacunaciones que iniciaron el día 0 con 0,5 mg de veneno enriquecido con 0,05 mg de PLA2 con Adyuvante completo de Freund por única vez y finalizó con la inoculación al día 203 con 45 mg de veneno y 4,5 mg de la enzima aislada con Adyuvante incompleto de Freund. La PLA2 fue obtenida del veneno

de *B. diporus* mediante combinación de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. Previo a cada vacunación, se obtuvo muestra de suero del equino (20 ml) a fin de detectar la presencia de anticuerpos y determinar su título (mediante test de ELISA), como así también se evaluaron los niveles de cada tipo de antitoxina contra los componentes principalmente responsables de la toxicidad, en cada uno de los estadios del plan de inmunización, determinándose la capacidad de neutralización de la actividad proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta por parte del suero obtenido del equino sometido a la inmunización. La aplicación de un protocolo alternativo, esto es, con veneno enriquecido con PLA2 purificada del veneno de *B. diporus*, a un equino no inmunizado previamente, permitió constatar la rápida elevación en el nivel de antitoxinas anti-PLA2, pudiendo el suero equino obtenido neutralizar, en un plazo sensiblemente menor, 119 días, y con un bajo tenor de toxinas (17 mg). Se completó la inmunización del equino, acortándose considerablemente el protocolo de inmunización si se considera que en el plan de inmunización convencional fueron necesarios, en total, 80 mg suministrados a lo largo de 161 días. Si bien las lesiones en la zona de inoculación se manifestaron en cada una de las instancias de inyección del inmunógeno, probablemente debidas a las enzimas proteolíticas y fosfolipasas de acción necrótica e inflamatoria respectivamente, el incremento en la proporción de fosfolipasas no afectó en mayor medida la extensión de las lesiones generadas *per se*. Estos resultados aportan valiosa información sobre la posibilidad de generar protocolos alternativos, consistentes en el empleo adicional de toxinas específicas, a fin de forzar a una rápida respuesta e inmunizar con elevados títulos en menor tiempo, en pro de reducir la exposición del animal productor de suero antiofídico a los efectos deletéreos que induce el veneno entero.

10- Utilidad del ELISA de avidéz para evaluar planes de inmunización con la vacuna de neumonía bovina

Díaz A. *, Almozni B., Sotello A., Mangone F., Canellada A., Castro M.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Dr. Ricardo A. Margni" (IDEHU, CONICET-UBA).
Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* adiaz@ffyb.uba.ar

Las condiciones a las que está expuesto el ganado bovino son adversas conduciendo a la inmunosupresión de los animales y predisponiéndolos a contraer enfermedades. La Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB), de etiología polimicrobiana, genera distres en las vías respiratorias desencadenado severos brotes de neumonía que pueden culminar en la muerte de los animales. Si bien en el campo se emplean vacunas comerciales, éstas no siempre proveen un control adecuado de la enfermedad, y a su vez, la respuesta inmune protectora no está del todo comprendida y los ensayos inmunodiagnósticos no están definidos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue emplear un ELISA de avidéz para evaluar la respuesta inmune conferida por la vacunación contra ERB en el ganado bovino frente a los agentes bacterianos causantes de la enfermedad: *Pasteurella multocida*(PM) y *Mannheimia haemolytica* (MH). Para cumplir este objetivo, el primer objetivo parcial fue desarrollar la puesta a punto de la técnica en nuestro laboratorio empleando sueros provenientes de nuestro modelo murino de vacunación. Se llevaron a cabo planes de inmunización en ratones y en dos rodeos bovinos empleando una vacuna comercial y vacunas experimentales. Distintos lotes de ratones recibieron 3 dosis (días 0, 15 y 27) de una vacuna comercial, o vacunas experimentales con PM y MH y distintos adyuvantes (hidróxido de aluminio(HA), Adyuvante de Freund Incompleto (AFI) y el adyuvante polimérico Montanide Gel01 (Monta)) y se sangraron a t0, t10, t27 y t37. Los sueros se diluyeron 1/1000 para el ELISA de avidéz y se incubaron con urea 6M. En bovinos se hicieron dos planes de inmunización en terneros recién destetados. En el 1er plan, los animales (n=10) recibieron 3 dosis separadas 21 días de una vacuna comercial o una vacuna experimental del sobrenadante de cultivo de PM. En el segundo plan, los bovinos (n=7) recibieron 2 dosis (días 0 y 21) de otra vacuna experimental con Monta como adyuvante y PM o MH como inmunógenos, mientras que otro grupo recibió la vacuna

comercial. En ambos planes hubo una vaca control que solo recibió adyuvante. Dependiendo del plan las vacas fueron inmunizadas y sangradas los días 0, 21, 42 y 60. Se evaluaron los niveles de IgG específica para PM y MH empleando un ELISA indirecto, y para el ensayo de avidéz se adaptó el ELISA empleando urea 6M como agente disociante. En el modelo murino, las vacunas experimentales con HA y AFI generaron niveles de anticuerpos similares a la vacuna comercial, mientras que la vacuna con Monta generó títulos de IgG mas altos para ambas bacterias. Los ELISAs de avidéz no mostraron diferencias significativas entre vacunas. Con respecto al modelo bovino, en el 1er plan se observaron diferencias entre los títulos de IgG entre la vacuna comercial y el sobrenadante PM ($p<0,05$) y con el placebo ($p<0,001$). El ensayo de avidéz arrojó diferencias entre el placebo y la vacuna comercial ($p<0,05$) y entre placebo y la vacuna con el sobrenadante PM ($p<0,001$). En el 2do plan, la vacuna con Monta como adyuvante presentó una tendencia a generar mayores niveles de anticuerpos que la vacuna comercial. Sin embargo, el ensayo de avidéz demostró diferencias entre el placebo y las vacunas experimentales con Monta ($p<0,05$). Observamos que el plan de vacunación genera anticuerpos específicos en ambos modelos contra las bacterias causantes del ERB, y comprobamos que la vacuna experimental con sobrenadante de cultivo es menos efectiva para producir anticuerpos, comparada con la vacuna compuesta con bacterias enteras. Con respecto al ensayo de avidéz, se concluye que esta técnica permite evaluar la calidad de la respuesta inmune generada por vacunación en bovinos ya que permite discriminar, aún mejor que evaluando los títulos, la respuesta generada. Los planes de vacunación controlados en bovinos junto con los ELISA de avidéz nos permitieron evaluar la respuesta inmune conferida por las vacunas y estudiar las posibles modificaciones sobre dosis e inmunógenos.

11- Potenciación de la inmunogenicidad inducida por una vacuna génica contra Herpes Virus Bovino tipo 1 mediante el uso de Galectina 8

Kornuta, C^{1,2}; Bidart, J^{1,2}; Tribulatti, V²; Campetella, O²; Carabelli, J²; Langellotti, C^{1,2}; Zamorano, P^{1,2,3}

¹ Instituto de Virología-CICVyA, INTA;
² CONICET; ³ USAL

Las galectinas (Gals) constituyen una familia de lectinas solubles con alta afinidad a beta-galactósidos, las cuales a través de su unión a glico-receptores de la superficie celular inducen múltiples respuestas celulares, tales como proliferación, apoptosis, diferenciación, adhesión, migración y secreción de citoquinas. Está reportado que una única dosis de Gal-8 administrada en ratones, junto con bajas dosis de antígeno modelo (OVA), fueron capaces de coestimular la respuesta T in vivo (Tribulatti et al 2012). Se sugiere un rol de Gal-8 en el inicio de una respuesta inmune adaptativa y su potencial aplicación en formulaciones vacunales, donde podrían actuar como adyuvantes. Recientemente hemos demostrado que potencia la respuesta humoral y protectora cuando se la aplica junto con el Virus de la Fiebre Aftosa. En la búsqueda de mejorar la protección inducida por una vacuna génica frente al Herpes Virus Bovino tipo 1 (HVBo-1), se pretende potenciar la mencionada vacuna mediante el uso de Gal 8. Se cuenta con una molécula sintética de Galectina 8. En este trabajo se utilizaron ratones BALB/c; los cuales se inmunizaron con una vacuna a ADN que codifica para la versión secretada de la glicoproteína D de HVBo-1 utilizando como vector pCIneo (pCIgD). Ratones BALB/c (n=5) fueron

inoculados por vía intradérmica los días 0 y 20 con: pCIgD; pCIgD y Gal 8 (90ug); pCIneo (como control negativo). En las formulaciones se usó: 15ug de pCIgD o pCIneo y 90ug de Gal 8 producida en *E. coli* (libre de LPS). Los sueros de los ratones fueron evaluados por ELISA contra HVBo-1. A los 40 dpv, el grupo que contenía en su formulación Gal 8 (90ug), presentaron diferencias significativas ($p < 0.5$) en el nivel de anticuerpos totales con respecto al grupo pCIgD. El nivel de anticuerpos contra HVBo1 inducido por pCIgD + Gal 8 fue de 2.86 ± 0.3 y en el grupo pCIgD fue de 2.2 ± 0.33 , mientras que en el grupo control negativo no se detectaron anticuerpos. Al evaluar en los sueros los isotipos inducidos a 40 dpv, se detectó un incremento significativo en los niveles de IgG2a, IgG2b e IgG3 en los animales que recibieron pCIgD + Gal8 respecto al grupo pCIgD. Estos resultados son alentadores en la búsqueda de potenciar la vacuna a ADN, ya que se observa buena respuesta humoral específica. Este trabajo debe complementarse con una evaluación a nivel celular para estudiar lo que sucede con la respuesta citotóxica y de esta manera conseguir una visión global del efecto que tiene Gal 8 formulada en combinación con la vacuna génica.

12- Análisis de la actividad proteolítica en leche de vacas con mastitis clínicas y subclínicas infectadas con *S. aureus*

Caggiano, N*; Pareja, R; Belitzky, N; González Wulfsohn, G; De Simone, E.

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Fisiología Animal.

*ncaggiano@fvvet.uba.ar

La mastitis es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente la producción láctea y la calidad de la leche. Su tratamiento y control es de vital importancia en los esquemas productivos lecheros. *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno causal de mastitis clínicas y subclínicas. Datos epidemiológicos de la provincia de Buenos Aires ubican a *S. aureus* como el patógeno más aislado tanto en muestras de leche de bovinos con mastitis clínicas como subclínicas. Nos propusimos evaluar la actividad de distintas proteasas y cómo se afectan distintas fracciones proteicas de la leche en animales con mastitis clínicas y subclínicas infectados con *S. aureus*. Se muestrearon cuartos individuales de 60 vacas y vaquillonas de tambos de la Prov. de Bs As, dividiéndose en los siguientes grupos: 20 sanas (S), 20 *S. aureus* subclínicas (SAS) y 20 *S. aureus* clínica (SAC). Se realizó la prueba de mastitis californiana y cultivo bacteriológico para determinar los grupos. Los animales sin signos clínicos y menos de 200.000 cél/ml ingresaron al grupo S, los animales con más de 200.000 cél/ml y sin signos clínicos ingresaron al grupo SAS, los que tenía signos clínicos ingresaron al SAC. La determinación de las MMP-2 y 9 fue mediante zimografía en gelatina, y en caseína para la actividad caseinolítica. Para la evaluación de las proteínas se realizó SDS-PAGE en un gel con 12% de acrilamida. La concentración de proteínas totales se determinó mediante la utilización del kit Proti 2 de Wiener lab., Argentina. Se usaron ANOVA One Way y test de Tukey como análisis estadístico. En la evaluación de la MMP-2 se observaron diferencias significativas entre los grupos S y SAS, con mayores niveles de actividad en el grupo S ($p < 0,05$). En la actividad de la MMP-9 se observaron diferencias significativas entre los grupos S y SAS ($p < 0,01$) y

S y SAC ($p < 0,05$). La actividad caseinolítica total fue mayor en los grupos SAS y SAC que en el grupo S. La concentración de proteínas totales no tuvo diferencias entre los grupos. Se observó que la concentración de caseína total fue menor en el grupo SAC ($0,94 \text{ g/dl} \pm 1,09$), mientras que en los grupos SAS fue de $2 \text{ g/dl} \pm 0,63$ y en el S de $2,56 \text{ g/dl} \pm 0,95$. Hubo diferencias significativas entre los grupos S y SAS ($p < 0,01$) y S y SAC ($p < 0,001$). La fracción de caseína más afectada fue la kappa que se vio disminuida en igual proporción en los grupos SAS y SAC, dando diferencias significativas ambos grupos en relación al grupo S ($p < 0,001$). De las proteínas del lactosuero la más afectada fue la lactoalbúmina que tuvo concentraciones menores en el grupo SAC que los grupos SAS y S, con diferencias significativas. Las proteínas de alto peso molecular aumentaron solo en el grupo SAC. Se pudo observar un aumento en la actividad tanto de la MMP-9 como de la actividad caseinolítica total en los grupos SAS y SAC, en el grupo S la principal proteasa fue la MMP-2. Por lo tanto a la hora de instaurar una terapia anti MMPs no sería adecuado inhibirlas a todas ya que la MMP-2 podría estar cumpliendo un rol fisiológico. Si bien la caseína total se ve afectada en los grupos SAS y SAC, la mayor disminución se observa a nivel de la kappa-caseína que se ve afectada de la misma manera tanto en las mastitis subclínicas como en las clínicas. En la industria láctea la caseína es uno de los componentes más importantes para la producción de quesos. Una de las principales consecuencias de la presencia de proteasas en la leche es la degradación de su principal proteína, la caseína. Por estos motivos la sanidad de la ubre podría traer consecuencias que van más allá de la merma en la cantidad de la leche producida.

13- Evaluación de la respuesta inmune humoral en cerdos vacunados y desafiados con un aislamiento local de *Mycobacterium bovis*

Cuerda, MX^{1,2}; Colombatti Olivieri, MA^{1,2}; Maldonado, V¹, Kissam, G¹, Barandiarán, S^{2,3}; Garrido, J⁴, Sevilla, I⁴, Romano, MI^{1,2}; Santangelo, MP^{1,2}.

¹ Instituto de Biotecnología, CICVyA INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.

² CONICET, Godoy Cruz 2290 (C1425FQB) CABA, Argentina.

³ Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Cs. Veterinarias (UBA), Buenos Aires, Argentina.

⁴ Neiker-Tecnalia, Departamento de Salud Animal, Derio, Bizkaia, España.

E-mail: cuerda.maria@inta.gob.ar

Introducción: La Tuberculosis Porcina (TBp) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico, causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, pero también por otras micobacterias del complejo *Mycobacterium avium*, pudiendo existir además co-infección. La principal vía de ingreso es la oral por ser alimentados con productos lácteos no pasteurizados o desechos de mataderos no sometidos a esterilización. A nivel mundial, *M. bovis* es una de las 10 causas más importantes de pérdidas económicas en la producción porcina, además de tratarse de una zoonosis. Actualmente, el diagnóstico utilizado para la TBp es la intradermorreacción, que es de adhesión voluntaria y resulta con considerables falsos positivos y negativos en las piaras. Por lo tanto, es una técnica que no se realiza de forma rutinaria y por ello la información existente sobre el estado sanitario de los establecimientos no se conoce. Se estima que la prevalencia de TBp en Argentina fluctúa entre 8.4% a 0.6% (SENASA, 2015) mediante la observación directa de lesiones compatibles con tuberculosis en las plantas frigoríficas. Actualmente no existe una vacuna ni un test diagnóstico eficaz para detectar los animales infectados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral de cerdos vacunados y desafiados con *M. bovis* mediante la técnica de ELISA. **Materiales y Métodos:** 20 lechones *Sus scrofa domestica* de 1 mes de edad, machos y hembras de la raza Landrace, provenientes de un criadero libre de tuberculosis. Se dividieron en 2 grupos homogéneos de 10 animales. Un grupo fue vacunado por vía oral con dos dosis de 106 de una cepa de *M. bovis* (inactivada por calor

en PBS) separadas por 30 días (T0 y T30) y un grupo control sin vacunar. A los 40 días post-vacunación (T70) se realizó el desafío de los 20 animales por vía oral con una dosis de 105 de una cepa local virulenta de *M. bovis*. Se tomaron muestras de suero a los tiempos T0, T30, T70, T100, T140 y T170 días para realizar la medición de anticuerpos por la técnica de ELISA. Se utilizó como antígeno un extracto celular de *M. bovis* AN5 el cual fue absorbido en placas de ELISA Nunc MaxiSorp de 96 pocillos. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/50, sembrado por duplicado junto a los controles positivos y negativos, y como sistema de revelado se utilizó anti-IgG porcina conjugado a HRP (Sigma®) con ABTS. Se realizó la lectura de la densidad óptica a $\lambda=405\text{nm}$. **Resultados:** Al tiempo T0, T30 y T70 (pre-desafío), no se detectaron anticuerpos en ninguno de los dos grupos. Luego del primer mes post-desafío (T100) comenzaron a aumentar los valores de OD en ambos grupos, siendo significativamente mayores en el grupo control sin vacunar (test estadístico t-student, $p<0.05$). A los dos meses post-desafío (T140) 3/10 animales de cada grupo resultaron positivos por la técnica de ELISA, comparables a los valores de OD de los controles positivos. **Conclusiones:** El desarrollo de un ELISA utilizando un extracto total de *M. bovis*, permitió la detección de anticuerpos luego del desafío, en algunos casos a partir del mes post- desafío, y aumentando los títulos de anticuerpos a medida que progresa la infección. Este ensayo se encuentra en curso, por lo que los animales serán necropsiados para confirmar la presencia de lesiones y la validación de la técnica de ELISA.

14- Análisis fenotípico de células mononucleares de sangre periférica de terneras inmunizadas con *Neospora caninum* antes de alcanzar la pubertad

Hecker Y.P.^{1,2*}, Soria I.³, Gamella M.³, Quattrocchi V.³, Langellotti C.^{1,3}, Fiorani F.^{1,2}, Gual I.^{1,2}, Campero L.M.^{1,4}, Leunda M.R.², Venturini M.C.⁴, Zamorano P.³, Cantón G.², Moore D.P.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),
² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, Argentina;
³ INTA, Castelar, Morón, Argentina;
⁴ Lab. de Inmunoparasitología, FCV UNLP.

* hecker.yanina@inta.gob.ar

La neosporosis bovina, causada por el protozoo intracelular *Neospora caninum*, provoca abortos en bovinos generando severas pérdidas económicas a nivel mundial. Las mermas productivas que provoca justifican la necesidad de avanzar en el desarrollo de inmunógenos para su control. Entre los interrogantes relacionados con la temática planteada es relevante determinar si la inmunización de vaquillonas antes de la pubertad, con una cepa de *N. caninum* de virulencia reducida, es capaz de generar una infección crónica que prevenga la ocurrencia de aborto y/o transmisión vertical a su progenie. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los niveles de linfocitos T CD4+ (LT CD4+), CD8+ (LT CD8+) y $\gamma\delta$ + (LT $\gamma\delta$ +) en terneras inoculadas con taquizoítos vivos de la cepa local NC-Argentina LP1 antes de alcanzar la pubertad. Se utilizaron 48 terneras Aberdeen Angus seronegativas a *N. caninum* de entre 6 y 8 meses de edad, seronegativas también a otros patógenos reproductivos. Las terneras fueron asignadas al azar en 2 grupos: Grupo A (n = 24): animales inmunizados por vía subcutánea (SC) con una dosis de 1×10^6 taquizoítos vivos de la cepa local NC-Argentina LP1 en 3 ml de solución fisiológica estéril (SFE); Grupo B (n = 24): animales inoculados con placebo (SFE). Se recolectaron muestras de sangre para obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) los días 0, 11, 15 y 21 post inoculación (PI). Fueron utilizados anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos FITC o PE (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EE.UU) para realizar las marcaciones anti-CD4 (IgG2a, CC8 clon), anti-CD8 (IgG2a, CC63 clon) y anti-WC1 para diferenciar poblaciones celulares de LT $\gamma\delta$ (IgG2a, CC15 clon) (AbD Serotec, Raleigh, North Carolina, EE.UU). El análisis fue

realizado utilizando un citómetro FACScan y *software* CellQuest (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Se analizó la varianza para medidas repetidas en el tiempo usando GraphPad Prism versión 5 v.5.01 (San Diego, CA, EE.UU.) y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$. Al momento de iniciar el ensayo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de LT CD4+ ($20,8\% \pm 3,31$), LT CD8+ ($9,74\% \pm 2,49$) ni LT $\gamma\delta$ + ($16,48\% \pm 0,80$) entre animales de los Grupos A y B. Cuando se realizó el análisis a través del tiempo se observó una disminución en los porcentajes de células LT CD4+ ($8,24\% \pm 1,74$) y LT $\gamma\delta$ + ($9,07\% \pm 3,04$) ($P < 0,05$) en el grupo A en relación al grupo B, desde el día 0 al día 15 PI, sin embargo, al día 21 PI los porcentajes tanto de LT CD4+ como de LT $\gamma\delta$ + retornaron a sus valores iniciales. No se observaron variaciones en los porcentajes de las poblaciones de LT CD8+ entre el grupo A y B a través del tiempo ($P > 0,05$). Una disminución transitoria de los niveles de LT CD4+ en vaquillonas que recibieron una formulación de taquizoítos vivos vía endovenosa pre servicio ha sido previamente reportada. La disminución en los niveles de LT $\gamma\delta$ + en las terneras del grupo A podría evidenciar una activación de esta población celular y migración a los tejidos linfáticos periféricos para la activación de una respuesta inmunitaria local post inmunización. Cuando estas hembras bovinas alcancen la madurez sexual se evaluará la respuesta inmunitaria generada durante su primera gestación y se analizará si esta estrategia de inmunización es capaz de prevenir la transmisión vertical de la infección a la progenie.

15- Expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica de terneras inmunizadas con *Neospora caninum* antes de alcanzar la pubertad

Hecker Y.P.^{1,2*}, Regidor-Cerrillo J.³, Horcajo P.³, Gual I.^{1,2}, Torioni S.⁴, Fiorani F.^{1,2}, Pereyra S.², Ortega-Mora L.M.³, Echaide I.⁴, Cantón G.², Moore D.P.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, Argentina;

³ SALUVET, Grupo de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España;

⁴ INTA Rafaela, Argentina,

* hecker.yanina@inta.gob.ar

Neospora caninum es un protozoo intracelular obligado, causante de abortos y graves pérdidas económicas en la industria ganadera mundial, lo que justifica la necesidad de avanzar en la comprensión de los mecanismos inmunes que brindan protección contra la enfermedad. Aunque se han realizado numerosas investigaciones en el desarrollo de inmunógenos para su control, son varios los interrogantes que aún se plantean. Se ha hipotetizado que la inoculación de una cepa viva de *N. caninum* en terneras prepúberes genera respuesta inmunitaria sin provocar infección crónica en el animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión génica de citoquinas en terneras inoculadas con taquizoítos vivos de *N. caninum* antes de alcanzar la pubertad. Se utilizaron 48 terneras Aberdeen Angus seronegativas a *N. caninum* de entre 6 y 8 meses de edad libres de otras enfermedades reproductivas. Las hembras fueron asignadas al azar en 2 grupos: Grupo A (n = 24): animales inoculados por vía subcutánea (SC) con una dosis de 1×10^6 taquizoítos vivos de la cepa NC-Argentina LP1 en 3 ml de solución fisiológica estéril (SFE); Grupo B (n = 24): animales inoculados con placebo (SFE). Se extrajeron muestras de sangre para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) los días 0, 11, 15 y 21 post inoculación (PI). Todas las hembras inmunizadas incrementaron sus niveles de IgG total a partir del día 21 PI (Hecker *et al.* 2016, AAVLD 2016). El ARN se extrajo de las CMSP utilizando TRIzol® reagent de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Sci., CA,

EEUU). Se evaluó la expresión de citoquinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 y TNF- α) mediante transcripción reversa y PCR en tiempo real y se determinó el *ratio* IgG1/IgG2 mediante un ELISA *in house*. En el Grupo A se observó un aumento significativo en la expresión de IL-12 a partir del día 11 PI ($P < 0,01$), y de IFN- γ y TNF- α al día 21 PI ($P < 0,01$). No se hallaron diferencias en la expresión de IL-10 a través del tiempo ($P > 0,05$). No se observó expresión génica de IL-4 en ninguno de los animales de los grupos experimentales. A partir del día 21 PI, se detectó un *ratio* IgG1/IgG2 menor a 1, con una respuesta predominante de tipo IgG2. Estos hallazgos evidencian que la inoculación de taquizoítos vivos de *N. caninum* en terneras prepúberes generó una respuesta inmunitaria caracterizada por un aumento en la expresión de IL-12, IFN- γ , TNF- α y producción de IgG2. El aumento más temprano de la expresión de IL-12, probablemente se deba a la activación primaria de la respuesta inmunitaria innata. Por otro lado, la expresión constante de IL-10, citoquina reguladora antiinflamatoria, evidenciaría que si bien se indujo una respuesta proinflamatoria PI, la misma no fue exacerbada y no requirió la activación de una respuesta de IL-10 regulatoria. Este ensayo continuará cuando estas hembras sean sexualmente maduras, momento en que se evaluará la respuesta inmunitaria y se comprobará si ocurre una transmisión transplacentaria endógena a su progenie en su primera gestación.

SESIÓN 2: ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS E INMUNIDAD FRENTE A INFECCIONES

16- Estudio serológico de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en caninos de zonas rurales en la provincia de Salta

Pintos L. A.^{1*}, Rambeaud M.^{2,3}, Campero L. M.^{2,3}, Trova G. B.¹, Borelli M.¹, Salomón F.¹, Sánchez Negrette O.^{1,4}, Venturini M.C.²

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta, Salta, Argentina.

² Laboratorio de Inmunoparasitología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

³ CONICET

⁴ Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

* luale06@hotmail.com

Neospora caninum y *Toxoplasma gondii* son protozoarios del Phylum *Apicomplexa*, filogenéticamente muy cercanos entre sí, aunque poseen distintos hospedadores. Ambos parásitos afectan a los caninos domésticos y salvajes, los que se infectan al ingerir tejidos de animales infectados, actuando como hospedadores definitivos de *N. caninum*, y hospedadores intermediarios de *T. gondii*, teniendo tropismo principalmente por el sistema nervioso. Además, *N. caninum* es uno de los principales agentes causantes de abortos en bovinos lo cual genera importantes pérdidas productivas y económicas. El método de rutina para el diagnóstico serológico de ambas enfermedades en perros es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). El objetivo del trabajo fue evaluar la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* y anti-*T. gondii* en sueros de perros provenientes de establecimientos ganaderos lecheros, de cría, y con sistemas mixtos de la región central y oeste de la provincia de Salta. Se obtuvieron muestras de sangre de perros rurales desde octubre de 2016 hasta agosto de 2017. De cada perro muestreado se identificó sexo, edad aproximada, y tipo de producción ganadera del establecimiento de procedencia. Las muestras se obtuvieron de la vena cefálica antibraquial y fueron transportadas en conservadoras con refrigerantes al laboratorio. Una vez obtenido el suero se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. En el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA, FCV, UNLP), se analizaron los sueros por la prueba de IFI utilizando antígenos de *N. caninum* (cepa NC-1) y de *T. gondii* (cepa RH) y como conjugado anti-IgG canina marcada con isotiocianato de fluoresceína para determinar la presencia de anticuerpos

anti-*N. caninum* y anti-*T. gondii*, respectivamente. Se procedió inicialmente a realizar un screening a fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* utilizando un punto de corte de 1:50. Aquellos sueros que resultaron positivos a dicho punto de corte fueron analizados hasta una dilución final de 1:800. De un total de 78 sueros analizados, 20 (26%) fueron positivos a *N. caninum*, con una distribución uniforme de títulos (4% título 800; 4% título 400, 5% título 200, 4% título 100, y 9% título 50) y 37 (47%) fueron seropositivos a *T. gondii* (3% título 800, 9% título 400, 12% título 200, 15% título 100, y 6% título 50). Catorce animales (18%) presentaron co-infección. No se detectó asociación entre el sexo de los animales y la presencia de anticuerpos - *N. caninum* y anti- *T. gondii*. La presencia de anticuerpos para ambos parásitos fue más elevada en perros mayores de 12 meses, lo que indicaría la importancia de la transmisión horizontal. Se detectaron más animales seropositivos para ambos parásitos en los sistemas de producción ganadera mixta que en los campos dedicados a cría o producción láctea, donde además la presencia de caninos fue muy baja (Test de Fisher). La provincia de Salta posee muchas zonas con características culturales, epidemiológicas, climáticas y de saneamiento ambiental escaso que hacen suponer favorezca el desarrollo y mantenimiento del ciclo biológico de *N. caninum* y de *T. gondii*. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evaluó la presencia de anticuerpos anti *N. caninum* y anti- *T. gondii* en perros rurales de la provincia de Salta.

17- Marcación de antígenos inmunodominantes específicos en diferentes estadios de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. y *Hammondia* spp.

Dellarupe, A.^{1,2*}; Moré, G.^{1,2}; Hemphill, A.³; Unzaga J.M.²; Campero, L.M.^{1,2}; Rambeaud, M.^{1,2}; Venturini, M.C.².

¹ CONICET;

² Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

³ Institute of Parasitology, Faculties of Veterinary Medicine and Medicine, University of Berne, Langgass-Strasse 122, CH-3012 Berne, Switzerland.

* adellarupe@gmail.com

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. y *Hammondia* spp. son parásitos estrechamente relacionados que pertenecen a la familia Sarcocystidae. El ciclo de vida de estos protozoos es indirecto e implica varios estadios (ooquistes (O), quistes (Q), bradizoítos (Bra) y taquizoítos (Taq)) en hospedadores definitivos (HD) e intermediarios (HI). *Toxoplasma gondii* y *H. hammondi* tienen al gato como HD, y el perro y otros cánidos actúan como HD para *N. caninum* y *H. heydorni*. Los cánidos son HD de numerosas especies de *Sarcocystis*, siendo *S. cruzi* una de las más estudiadas por su presencia en músculos de bovinos (HI). La neosporosis es una importante causa de abortos en bovinos y de cuadros neurológicos en caninos. El diagnóstico serológico de esta infección presenta la dificultad de diferenciación entre casos agudos y crónicos. Existen diversos antígenos inmunodominantes (AID) que serían de ayuda para la identificación de diferentes estadios del protozoo. El objetivo de este trabajo fue, por una parte, evidenciar AID específicos en diversos estadios de *N. caninum*, (O, Q, Bra y Taq), con anticuerpos ampliamente difundidos y comparar las marcaciones con las de protozoos estrechamente relacionados como *T. gondii* (Q, Taq, O), *H. heydorni* (O) y *Sarcocystis* spp. (Q, Bra, esporocistos). Por otra parte, se llevó a cabo un protocolo de conversión Taq-Bra, y se evaluó la eficiencia de conversión del aislamiento local Nc-6 Argentina de *N. caninum* mediante marcación de AID específicos, con el fin de analizar su utilidad en el diagnóstico. Los Taq de *N. caninum* y *T. gondii* se obtuvieron de cultivo de células infectados con los mismos; los Q de *T. gondii* de SNC de ratones experimentalmente infectados y los de *S. cruzi* de músculo cardíaco de bovino. Los O y esporocistos fueron obtenidos de materia fecal de gato, perro y comadreja y su identidad confirmada por métodos moleculares. Los Bra de *S. cruzi* se obtuvieron por digestión artificial de músculo cardíaco bovino. Los

Bra y Q de *N. caninum* se obtuvieron llevando a cabo el protocolo de conversión Taq-Bra en cultivo de células VERO utilizando nitroprusiato de sodio como agente estresante. Las marcaciones se llevaron a cabo por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos policlonales (AcPol) anti BAG1 (específico de estadio de Bra de *T. gondii*) y SAG4 (específico de estadio de Bra de *N. caninum*) ambos producidos en conejo y Ac monoclonales (AcMo) anti NcSAG1 (específico de estadio de Taq de *N. caninum*), Nc-SAG4, y CC2 (específico de estadio de Bra de *T. gondii*), producidos en ratón. Se utilizaron conjugados Alexa 594 anti IgG de conejo y Alexa 488 anti IgG de ratón. Los AcPol anti BAG1 reaccionaron con Q de *T. gondii* y de *S. cruzi*, Bra de *N. caninum* y de *S. cruzi*. En el caso del AcPol SAG4 reaccionó tanto con estadios de Taq y Bra (Q) de los protozoarios testeados. Los AcMo NcSAG1 reaccionaron sólo con Taq de *N. caninum*, NcSAG4 no reaccionó con ningún estadio de los protozoarios analizados y CC2 reaccionó con Q de *T. gondii* y *N. caninum* y marcó de modo débil las paredes de los O de *T. gondii* y *H. heydorni*. Se concluye que el AcPol BAG1 es estadio específico pero no especie específico y el AcMo CC2 marca paredes de Q y O de diferentes protozoos. Por otra parte el SAG4pol marca Taq y Bra de diferentes protozoos por lo que no sería un marcador específico de elección. NcSAG1 es altamente específico de Taq de *N. caninum* y no reacciona de modo cruzado con los otros protozoos. Respecto del ensayo de conversión Taq-Bra sólo se logró una conversión parcial en muy bajo porcentaje, identificado por las marcaciones específicas de AcMo NcSAG1 y CC2 y AcPol BAG1. Sobre la base de estos resultados, consideramos que la producción de Bra de *N. caninum* a gran escala con fines diagnósticos sería muy laboriosa y poco práctica, por lo que deberían considerarse métodos alternativos.

18- Desarrollo de una prueba de ELISA indirecta basada en péptidos conservados para la detección de anticuerpos contra *Babesia bigemina*

Mosqueda J.^{1,4*}, Mercado-Uriostegui M.A.^{1,2}, Valdéz-Espinoza U.M.^{1,3}, Aguilar-Tipacamú G.⁴, Ramos-Aragón J.A.⁵, Hernández-Ortiz R.⁵

¹ Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

² Maestría en Ciencias en Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

³ Posgrado en Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

⁴ CA Salud y Animal y Microbiología Ambiental, FCN, UAQ, Querétaro, México.

⁵ CENID-Parasitología-INIFAP, Jiutepec, Morelos, México.

* joel.mosqueda@uaq.mx

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria intraeritrocítica ocasionada por protozoarios del género *Babesia* y es transmitida por garrapatas. Esta enfermedad causa pérdidas económicas y muertes en el ganado bovino en zonas tropicales y subtropicales. Las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* ocasionan pérdidas económicas en la ganadería e industria alimentaria a nivel mundial. Actualmente el diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Babesia* se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta, sin embargo, esta técnica tiene desventajas serias como baja sensibilidad y especificidad, además de requerir de personal experimentado. Existen epítomos B en proteínas involucradas en la invasión de *Babesia* a las células del hospedero con funcionalidad biológica indispensable y que generan anticuerpos en todos los animales infectados. Estos anticuerpos pueden ser utilizados para el diagnóstico de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una prueba de ELISA indirecta basada en péptidos para la detección de anticuerpos contra *B. bigemina* en sueros de bovinos de zonas endémicas. Se realizó la selección bioinformática de epítomos B de proteínas de membrana de *B. bigemina* realizando un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del NCBI) con la secuencia de las proteínas MIC1 y GP45 de *B. bigemina* para seleccionar, en las regiones expuestas de las proteínas maduras, péptidos específicos para esta especie. Las regiones inmunogénicas y los epítomos B fueron predichos con los programas ABCpred, IEDB y BCEpred. Se identificaron péptidos en regiones expuestas, conservadas e inmunogénicas y que contienen epítomos B predichos para cada proteína. Los péptidos se generaron por síntesis química en forma de dendrímeros de 8 ramas. Posteriormente se evaluó la capacidad de identificar la presencia de anticuerpos contra *B. bigemina* en sueros de bovinos de zonas endémicas. Se utilizaron 115 sueros para MIC1 y 111 para GP45 respectivamente y 6 sueros (con-

troles negativos) de bovinos nacidos en una zona libre de garrapatas. Los sueros fueron evaluados por inmunofluorescencia indirecta. Se forraron las placas con 10µg/ml del péptido MIC1A o GP45A diluidos en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS Tween 20, pH 7.4 al 0.05%. Se realizó el bloqueo por una hora a 37°C con leche descremada al 5% en PBS, pH 7.4. Al terminar el bloqueo se repitió el paso del lavado. Después se agregaron por triplicado 100 µl de suero de bovinos de campo diluidos 1:50 en PBS y se incubaron una hora a 37°C. Se repitió el lavado y se agregó el anticuerpo secundario (Anti-IgG de bovino hecho en cabra acoplado a peroxidasa) y se incubó por una hora a 37°C. Finalmente se revelaron las placas con OPD y peróxido de hidrógeno. Se realizó la lectura de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm. Se determinó el punto de corte utilizando el promedio de las absorbancia de uno de los sueros negativos más tres veces su desviación estándar. Todos los sueros con valores de O.D. arriba del punto de corte se consideraron positivos. Se calculó la sensibilidad, especificidad, concordancia, y valores predictivos (positivo y negativo). Los resultados mostraron 97.41% y 95.49% de sensibilidad, 100% de especificidad, 97.54% y 95.72% de concordancia, 100% de valor predictivo positivo y 100% de valor predictivo negativo para detección de anticuerpos contra los epítomos B de las proteínas MIC1 y GP45 respectivamente. Las pruebas de ELISA desarrolladas en el presente trabajo tienen la capacidad de detectar anticuerpos contra *B. bigemina* de manera específica y sensible a partir de sueros de bovinos de zonas endémicas infectados de manera natural. La identificación de epítomos B conservados es esencial para el desarrollo de pruebas de diagnóstico automatizadas, sensibles y específicas como la ELISA indirecta.

Financiado por: PRODEP-REDES y FOFIUAQ.

19- Dinámica de los anticuerpos anti *Mycoplasma hyopneumoniae* durante un brote y posterior a un programa de control en una granja porcina

Camacho P.^{1*}, Estanguet A.¹, Tamiozzo P.¹

¹ Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, ruta 36 km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina CP: 5800.

*pablocamacho1@hotmail.com

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) es el patógeno primario de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una enfermedad respiratoria crónica de los cerdos. Las infecciones ocurren en todo el mundo y causan grandes pérdidas económicas a la industria porcina (Thacker & Minion, 2012). Para el control de la enfermedad, el uso de la vacunación, tratamiento antibiótico y manejo del flujo de animales e instalaciones son las herramientas más utilizadas (Maes et al., 2008). Las vacunas cobran especial importancia ya que permitirían controlar la NEP sin el uso indiscriminado de antibióticos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue observar la dinámica de anticuerpos anti *M. hyopneumoniae* durante un brote y posterior a un programa de control. Se realizaron dos estudios transversales en cerdos de un establecimiento de 1300 madres de dos sitios (sistema wean-to-finish) ubicado en la provincia de San Luis. El primero se realizó en el año 2013 durante un brote de NEP, y el segundo en el año 2017, posterior al plan de hiperinmunización en cerdas que se había implementado durante el brote como medida de control contra la enfermedad, mediante el cual todas las cerdas ingresaban al sistema reproductivo con al menos cinco dosis de vacuna contra *M. hyopneumoniae* (M+PAC, MSD, Salud Animal Argentina). En 2013 se muestrearon 15 cerdos (para detectar al menos un caso, estimando una prevalencia del 20% con un 95% de confianza) de cada una de las siguientes edades: 4, 7, 10, 13, 15, 18 y 22 semanas y en el año 2017 10 cerdos (para detectar al menos un caso, estimando una prevalencia del 30% con un 95% de confianza) de: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 semanas. La presencia de anticuerpos anti- *M. hyopneumoniae* (Inmunoglobulina G) se determinó mediante un kit de ELISA comercial (Herdcheck *M. hyopneumoniae*-IDEXX). En el

muestreo del año 2013, la proporción de seropositivos cae a las 7 semanas (33,3%) respecto al muestreo de las 4 semanas (93,7%), para luego comenzar a aumentar a las 10 (78,6%), 13 (94,1%) 15 (84,6%), 18 (100%) y 22 (100%) semanas de edad. En el muestreo del 2017, la proporción de seropositivos caen a 0% (a las 16, 18 y 20 semanas) respecto a los animales más jóvenes (100% de positivos a las 4 y 6 semanas de edad, 77% a las 8, 22% a las 10 y 12 semanas y 11% a las 14). A las 22 semanas de edad el 39% de los cerdos fueron seropositivos. La serología es una de las herramientas diagnósticas más utilizadas para la detección de *M. hyopneumoniae* en una población porcina, por ser una técnica económica y rápida. Junto con otras técnicas diagnósticas como la PCR y la signología clínica permite obtener valiosa información sobre la dinámica de la NEP (Camacho et al., 2014). En ambos muestreos se observó un retardo en la respuesta inmune. En el muestreo de 2013 entre las 7 y las 10 semanas de edad; mientras que en el muestreo de 2017 se observó entre las 20 y las 22 semanas de edad. El relativo retardo en la respuesta inmune humoral observado en 2013 concuerda con estudios anteriores (Andreasen et al., 2000; León et al., 2001), quienes informaron que la seroconversión de los animales en piaras sin medidas de control contra la NEP, tarda de 6 a 9 semanas post-infección. Además de la serología sería importante utilizar otras técnicas diagnósticas para poder determinar de manera precisa el momento de infección, que probablemente para el año 2017 por las medidas de control empleadas, hacen que la colonización de *M. hyopneumoniae* se vea disminuida y retarde aún más la seroconversión, pero más estudios se requieren para confirmar esto.

20- Dinámica de anticuerpos anti-*Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdas con diferente número ordinal de partos durante la gestación

Seitz, J.^{1*}; Menseguez, B.¹; Ferrero, S.²; Carranza, A.¹; Ambrogi, A.¹; Tamiozzo, P.¹

¹ Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria.

² Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-químicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 km 601. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. CP 5800.

*ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

La pleuropneumonia contagiosa porcina (PCP) es una enfermedad respiratoria causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* que produce importantes pérdidas económicas en la producción porcina (Gottschalk, 2012). La inmunidad pasiva juega un rol importante en la colonización e infección de los lechones (Vigre *et al.*, 2002). Respecto al número ordinal de parto de las madres existe información contradictoria ya que mientras que Sjolund *et al.* (2011) informaron niveles más altos de anticuerpos en hembras jóvenes, Fablet *et al.* (2011) lo informaron en hembras más viejas. Por ello el objetivo de este estudio fue analizar la dinámica de anticuerpos anti-*A. pleuropneumoniae* en cerdas con diferente número ordinal de partos durante la gestación. El estudio se realizó en una granja múltiple sitio de 4500 madres, endémicamente infectada con *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 15 y otros serotipos no identificados. No se vacunaba a los animales contra el agente. Se realizó un estudio longitudinal para lo que se tomó muestras de sangre de 88 hembras con diferente número ordinal de parto (de 1 a 9) a los días 0 y 55 de gestación y al post-parto. Para la detección de anticuerpos anti-*A. pleuropneumoniae* se utilizó el kit comercial apxIV ab App-IDEXX, que detecta anticuerpos contra la toxina apx IV, común a todos los serotipos del agente producida solamente en infecciones naturales. Debido a los resultados de los análisis descriptivos de las densidades ópticas (DO) de las hembras de tres o más partos se comportaban de igual modo (datos inéditos), se realizó un ANOVA de medidas repetidas de las DO de hembras de 1, 2 y 3 partos al día 0 de gestación, a los 55

días y al post parto utilizando el software R. A mayor número de partos de las hembras, mayores valores de DO fueron observados. Se evidenció interacción entre el momento del parto y el número ordinal de partos de las hembras. Al día 0 de gestación hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las DO de hembras de 1, 2 y 3 partos. A los 55 días de gestación y al post-parto sólo hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de las DO de hembras de primer parto respecto a las de segundo y tercero. Respecto al momento de la gestación, en hembras de primero y segundo parto hay un aumento de las DO a los 55 días de gestación, respecto a la día 0 para luego decaer hacia el post-parto. Este comportamiento sugiere primero una seroconversión producto de una infección activa en el área de gestación, considerando que no se vacunaba contra el patógeno. Luego una caída en las DO al post-parto, hecho que probablemente se deba a la transferencia de anticuerpos de la sangre a la glándula mamaria hacia el final de la gestación, hecho que ha sido informado en otro patógeno respiratorio como *M. hyopneumoniae* (Wallgren *et al.*, 1998; Rautiainen & Walgreen, 2001). Si bien las hembras de tercer parto se comportan levemente diferente, al no existir diferencia estadísticamente significativa respecto a las hembras del segundo parto al día 55 y al post-parto no se puede aseverar una dinámica diferente. Estos resultados son importantes ya que resaltan la importancia de un buen manejo sanitario de las hembras de reposición en el caso de infecciones causadas por *A. pleuropneumoniae*.

21- Mapeo de epitopes en la proteína principal del core del Virus de la leucosis bovina (BLV)

Gutiérrez, S.E.^{1*}; Larsen, A.²; Juliarena, M.A.¹; Panei, C.J.^{2,3}; Lutzelschwab, C.M.¹; Esteban, E.N.⁴; Mórtola, E.².

¹ Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CIC-CONICET-FCV UNCPBA, Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

² Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

³ Investigador de CONICET.

⁴ Programa BIOALPINA, Colonia Alpina, Santiago del Estero, Argentina.

* segutier@vet.unicen.edu.ar

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus que infecta naturalmente al bovino, siendo reconocido como el agente etiológico de la leucosis enzoótica bovina. Esta enfermedad está ampliamente diseminada en toda América, especialmente en establecimientos de producción lechera. Los datos más recientes en nuestro país (no publicados) indican una prevalencia de más de 90% de tambos infectados, con índices de infección superiores al 50% en la mayoría de los casos. Los animales infectados con BLV desarrollan anticuerpos (Acs) contra las principales proteínas estructurales del virus: la glicoproteína de la envoltura de 51kDa (gp51) y la proteína principal de la cápside de 24kDa (p24). Los test de diagnóstico generalmente detectan Acs anti-gp51, ya que alcanzan títulos superiores y generalmente aparecen antes que los Acs contra p24. Estudios previos muestran una alta correlación entre el título de anticuerpos anti-BLVp24 y la carga proviral, por lo que estos Acs son un buen marcador de carga proviral. El objetivo de este trabajo fue identificar epitopes reconocidos por linfocitos B en la proteína principal del core del BLV (BLVp24) y seleccionar herramientas útiles para el desarrollo de métodos serológicos precisos para dosar los Acs anti-p24 en animales infectados. La secuencia de la proteína fue obtenida de bases de datos (NCBI Reference Seq NP_777381.1). Esta secuencia se sometió a un análisis bioinformático (SEAL™, desarrollado por Abmart, Inc. Shangai, China). Se asignó un score a cada residuo, teniendo en cuenta hidrofobicidad, características estructurales, exposición a solventes, entre otros criterios.

Se identificaron 7 regiones con alto score y se obtuvieron 19 clones productores de Acs monoclonales contra los distintos péptidos. Se probó la reactividad de los Acs monoclonales contra la proteína BLVp24 producida en forma recombinante, mediante Western Blott. Tres de los 19 Acs probados mostraron fuerte reactividad contra la proteína BLVp24 recombinante, mientras que otros 4 Acs reaccionaron en forma débil, y los 12 restantes no reaccionaron. Los Acs que reaccionaron con mayor intensidad están dirigidos contra 2 de los 7 péptidos seleccionados, que se encuentran solapados en el extremo amino terminal de la proteína. Dos de los Acs que reaccionan en forma más débil reconocen una tercera región de la molécula. Los Acs que mostraron reacción en la técnica de Western Blott, también reaccionaron con la proteína adsorbida en placas de ELISA, siendo el nivel de reactividad proporcional al observado en Western Blott. Estos resultados nos han permitido seleccionar Acs monoclonales anti-BLVp24 y péptidos de la misma proteína para el diseño de futuros ensayos para la detección y/o cuantificación de Acs anti-BLVp24. Se estudiará la dominancia de los epitopes identificados por los Acs monoclonales que mostraron alto nivel de reactividad utilizando sueros de animales naturalmente infectados, y se evaluará su utilidad para el desarrollo de un ELISA de bloqueo. En caso de demostrarse su dominancia, los péptidos utilizados para desarrollar los Acs serían candidatos para ser utilizados como antígeno o trazador en una prueba de polarización de la fluorescencia.

22- Estudio de la relación de metaloproteasa-9 (MMP-9) y glicosaminoglicanos (GAGs) como biomarcadores inflamatorios diagnósticos en líquido sinovial de equinos

Caggiano^{1*}, N; Perrone², G; Lastra¹, Y; Rubatino¹, F; Soto¹, S; De Simone, E¹.

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias.

¹ Cátedra de Fisiología Animal.

² Cátedra de Producción Equina y Clínica de Grandes.

Av. Chorroarín 280. Buenos Aires - Argentina - C1427CWO. TEL: 4524-8400.

*ncaggiano@fvet.uba.ar

La osteoartritis es una enfermedad inflamatoria de gran incidencia en equinos deportivos, que afecta directamente su performance. La inflamación intraarticular se puede estudiar con más detalle mediante el análisis de enzimas catabólicas en el líquido sinovial. Previamente evaluamos la actividad inflamatoria articular mediante citoquinas y proteínas de fase aguda sin embargo las mismas permanecen elevadas por un breve periodo de tiempo dependiendo del estadio de la enfermedad y la gravedad de la misma. Por tal motivo uno de los biomarcadores más confiables de enfermedad articular resultó ser la actividad de la MMP-9. En este trabajo nos proponemos cuantificar los GAGs sinoviales y relacionarlos con la actividad de MMP-9. El nivel de GAGs siempre ha sido controversial ya que se ha especulado que los valores bajos u altos podrían estar relacionados con enfermedad articular. La MMP-9 ha sido relacionada previamente con el catabolismo de la matriz extracelular en procesos patológicos pero no se la ha relacionado con los niveles de GAGs en el líquido sinovial. Los procesos experimentales y protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL FCV-UBA). Las articulaciones del carpo y el tarso fueron seleccionadas para este estudio, ya que las mismas son de fácil accesos y es donde se producen las mayores patologías articulares. Se extrajeron por punción sinovial 131 líquidos sinoviales de animales de diferencia procedencia y usos, muchos de los cuales se encontraban retirados de la actividad deportiva por diferentes motivos.

Los líquidos sinoviales se centrifugaron y se conservaron a -20°C hasta su uso. Los GAGs fueron cuantificados mediante la prueba de 1,9-dimethylmethylenblue (DMMB) y la MMP-9 por zimografía en SDS-PAGE con el agregado de gelatina. Estas pruebas fueron validadas previamente para uso en equinos. Para el análisis estadístico se usó la prueba de Ji cuadrado. Se recurrió al software GraphPad Prism versión 6 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) y el nivel de significancia se consideró $P < 0.05$. Cuando se relacionó la presencia de MMP-9 con el valor de GAGs articular en líquido sinovial se obtuvieron los siguientes resultados cuando los GAGs fueron menores a 700 mcg/ml 19/34 animales fueron positivos a MMP-9. Mientras que cuando la medición de GAGs fue mayor a 700mcg/ml la proporción de animales positivos a MMP-9 fue de 10/64. Cuando se realizó el análisis de Ji cuadrado se observó una diferencia significativa de $p < 0.05$ ($p = 0.0031$). Estos resultados podrían estar indicando que para los valores de GAGs menores a 700mcg/ml la probabilidad de tener valores presentes de MMP-9 es significativamente mayor y por lo tanto que se trate de una articulación con enfermedad articular. Este trabajo de alguna manera estaría demostrando que los valores bajos de GAGs están asociados a mayor probabilidad de enfermedad articular. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de MMP-9 estaría relacionada con los bajos niveles de GAGs y asimismo esto sugiere enfermedad articular.

23- Procesamiento del material caseoso para determinar por PCR la presencia de *C. pseudotuberculosis* en ovinos

Marcellino R.^{1*}, Raineri M.¹, Mignaqui A.², Santana J.³

¹INTA, EEA Bariloche, Grupo de Salud Animal, Bariloche, Río Negro, Argentina.

²INTA CONICET, EEA Bariloche, Grupo de Salud Animal, Bariloche, Río Negro, Argentina.

³AER Río Gallegos, EEA INTA Santa Cruz, Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

*marcellino.romanela@inta.gob.ar

La Linfadenitis Caseosa (LAC), es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* que se caracteriza por la formación de abscesos en ganglios y órganos. En la Patagonia, es común el hallazgo de ovinos y caprinos adultos enfermos, ocasionando una disminución en la producción y el decomiso de los órganos o canales afectados, originando pérdidas económicas en el sector pecuario. La infección en los ovinos produce un material caseoso característico purulento, de color blanco-crema o verdoso, consistencia viscosa y adherente, en algunos casos se observa material calcificado. Ante la sospecha de LAC, el diagnóstico de rutina es el cultivo bacteriológico del material con la identificación del agente causal, lo que supone un largo tiempo diagnóstico. Alternativamente podrían utilizarse métodos más rápidos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Sin embargo, la consistencia adherente, pastosa o calcificada del material caseoso hace que su utilización para estos métodos sea poco reproducible y confiable. Con el fin de encontrar la mejor técnica para diagnosticar LAC, se está estudiando una PCR mejorada y se está poniendo a punto un ELISA directo para detectar *C. pseudotuberculosis* en material caseoso procesado, que luego serán correlacionadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la aplicación de un tratamiento previo en muestras de material caseoso permite optimizar los resultados obtenidos con la técnica de PCR para la determinación de *C. pseudotuberculosis*. A futuro se pretende evaluar si las muestras procesadas de esta forma pueden ser utilizadas para la detección de *C. pseudotuberculosis* por ELISA. Se procesaron 58 muestras de órganos y ganglios de 46 ovinos con sospecha de LAC provenientes de la provincia de Santa Cruz. Cultivo bacteriano: se realizaron cortes de los

abscesos y se tomaron muestras con un hisopo estéril para el aislamiento y la identificación de *C. pseudotuberculosis*. Tratamiento de la muestra: las muestras fueron procesadas de forma directa mezclando aproximadamente 50 mg de material caseoso con 150 µl de resina Chelex (Biorad, Argentina) o realizando un homogenato a partir de disgregar 50 mg de material con 200 µl de agua destilada estéril utilizando un pilón. Posteriormente 100 µl de homogenato fueron agregados a 150 µl de resina Chelex. Extracción de ADN: luego de incubar durante 20 min a 65 °C y posteriormente por 8 min a 100 °C, las muestras fueron centrifugadas (2 min, 10.000 g) y el sobrenadante recuperado. El ADN extraído se utilizó como templado en una reacción de PCR utilizando primers para el gen de la toxina fosfolipasa D producida por *C. pseudotuberculosis*, obteniéndose un producto de 203 pb. Los resultados de la PCR (muestra directa vs. homogenato) fueron analizados mediante el test χ^2 ($p < 0.05$), al igual que la comparación con los resultados obtenidos por cultivo. En el 100% de las muestras se aisló *C. pseudotuberculosis* por cultivo, coincidiendo con los resultados obtenidos por la técnica de PCR con homogeneización previa. Sólo una muestra resultó negativa por PCR cuando no se realizó un homogenato. A su vez, la mitad de las muestras que fueron homogeneizadas previamente mostraron un incremento en la intensidad de la banda obtenida por PCR, mejorando su visualización. La concordancia entre los resultados obtenidos por cultivo y la PCR con el homogeneizado previo indica que este tratamiento debería tenerse en cuenta al procesar muestras con sospecha de LAC, ya que mejora la visualización de la banda amplificada por PCR, disminuyendo la repetición de muestras dudosas, reduciendo costos y demoras.

24- Producción y uso de un antisuero específico para IgA bovina

Rigo, Verónica^{1*}; Díaz Silva, Heydy¹; Gutierrez Betiana²; Zurita, Marcelo²; Mundo Silvia L.¹; Jar, Ana M.¹

Universidad de Buenos Aires.

¹Cátedra de Inmunología,

²Cátedra de Clínica Médica y Quirúrgica de Rumiantes y Cerdos. Facultad de Ciencias Veterinarias.

*veronica_rigo83@hotmail.com

Uno de los desafíos para controlar la paratuberculosis bovina es identificar los animales en estadio subclínico. Se observó que la sensibilidad y precisión del diagnóstico serológico pueden aumentar si se combinan los resultados de IgG e IgA. El objetivo de este trabajo es producir un anticuerpo específico para la IgA bovina, que se aplicará para desarrollar un IgA-ELISA-PPA como prueba diagnóstica complementaria de la paratuberculosis. Se plantea un abordaje biotecnológico, que consiste en la producción de la cadena pesada de la IgA (cadena alfa) como proteína recombinante para ser utilizada como inmunógeno. Amplificamos, clonamos y expresamos un fragmento correspondiente a la cadena pesada completa (1032 pb). Se realizó RT-PCR a partir de ARN total de células mononucleares de bazo, utilizando cebadores que insertan un sitio *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio *Hind*III en el extremo 3' de cada secuencia. Los amplicones se clonaron en el vector pRSET-A y la identidad de todas las secuencias se confirmaron por electroforesis capilar. Luego de haber optimizado las condiciones de producción, se logró la expresión del fragmento completo alfa en células competentes BL21(DE3)pLysS, como una proteína de fusión de aproximadamente 41 kDa, con una

cola de poli-histidinas. Se determinó que la proteína se expresa y almacena en cuerpos de inclusión y su extracción se realizó con tratamiento con urea. Se realizó la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de Níquel y finalmente se dializó en columnas Amicon®. La proteína alfa recombinante purificada se formuló con adyuvante incompleto de Freund y se utilizó para inmunizar cuatro ratones por vía subcutánea, con un programa estándar de inoculaciones quincenales. Luego de la cuarta inmunización, se realizó la mínima toma de muestra de sangre por la vena mandibular y se caracterizó el antisuero por DOT-ELISA. Se probó el antisuero con reacciones positivas, contra la proteína alfa recombinante purificada y contra muestras de suero bovino, mucus nasal, lágrimas y saliva. Se probó el antisuero contra patrones de IgG1 e IgG2 y BSA, y no se evidenciaron reacciones cruzadas. Esto constituye un desarrollo local que se aplicará en lo inmediato en el desarrollo de un IgA-ELISA-PPA y en un futuro, para profundizar el conocimiento sobre el papel de la IgA en la respuesta inmune del bovino en estados de salud y enfermedad.

25- Nueva herramienta para el diagnóstico de tuberculosis caprina

Rocha RV^{1*}, Bigi F¹, Eirin ME¹, Zumarraga MJ¹, Marfil MJ¹

¹ Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

* rocha.rosana@inta.gob.ar

M. bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina (TB), se encuentra diseminado a nivel mundial con un amplio rango de hospedadores, el cual incluye animales silvestres, animales de compañía y especies de importancia pecuaria como caprinos, ovinos, cerdos y búfalos. El hombre no es la excepción, dado que puede infectarse, constituyendo un problema de impacto en salud pública por tratarse de una zoonosis. Las técnicas moleculares por PCR que detectan la secuencia de inserción IS6110 permiten identificar *M. bovis* en distintos tipos de muestra. *M. bovis* se elimina por vía respiratoria y de forma intramamaria pudiéndose detectar en leche de animales en etapa de lactancia. El objetivo de este trabajo fue poner a punto un método molecular que permita identificar *M. bovis* en muestras de leche caprina. Se contaminó leche fluida de cabra en forma artificial con *M. bovis* BCG en diluciones seriadas. Se emplearon dos métodos de extracción de ADN, uno comercial y otro casero

denominado FCI. El ADN obtenido de cada muestra por ambos métodos se empleó como templado en un ensayo de PCR que amplifica una secuencia de inserción IS6110 del genoma de *M. bovis*. A su vez, se utilizaron dos tipos de enzimas, una de producción nacional y otra importada para los ensayos de PCR. Se obtuvo ADN en todas las muestras mediante los 2 métodos evaluados. Sin embargo, el método FCI fue más eficiente en términos cuantitativos como cualitativos. La enzima Taq importada mostró ser más sensible que la enzima Taq de producción nacional. En este trabajo demostramos que la leche fluida de cabra es una muestra adecuada para identificar *M. bovis* por métodos moleculares ya que aún a concentraciones bajas se puede detectar la presencia del bacilo. Si bien se requiere una validación a campo con leche de cabra naturalmente infectada, esta metodología brinda una herramienta muy valiosa para la identificación de majadas con tuberculosis.

26- Producción y desarrollo de un ELISA-PPA para el diagnóstico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en Ciervo Colorado (*Cervus elaphus*)

Hermida, H^{1*}; Colavecchia, S¹; Fortuny, ML¹; Suhevic J², Mereb, G³; Alonso, B⁴; Martinez Vivot, M⁵; Mundo, S¹.

¹ Inmunología, FCV-UBA, CABA, Argentina;

² Escuela Agropecuaria, FCV-UBA, CABA, Argentina;

³ Práctica profesional privada;

⁴ Área de Micobacterias de SENASA, Martínez, Buenos Aires, Argentina;

⁵ Enfermedades Infecciosas, FCV-UBA, CABA, Argentina.

*hernan.s.hermida@gmail.com

La paratuberculosis es una enfermedad crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). El diagnóstico en ciervos requiere del uso de reactivos específicos importados de alto costo. Nuestro objetivo es el desarrollo de un ELISA-PPA utilizando anticuerpos específicos producidos en nuestro laboratorio. Se semipurificó suero de ciervo (Igc) para producir anti-Ig (a-Igc-C) en conejos (n=2) se inmunizaron (2 dosis) de 1mg Igc + adyuvante de Freund incompleto, cada 15 días. Se purificó con proteína-A el a-Ig-C y se caracterizó mediante SDS-PAGE, Inmunoblot y ELISA. Se comparó su título con un anti-IgG de ciervo conjugado comercial (KPL). Se evaluó la reactividad frente a suero de ciervo y otras especies por ELISA utilizando un anti-IgG de conejo conjugado (KPL). El título del a-Igc-C producido fue mayor

al obtenido para el reactivo comercial (256000 vs. 400). Se detectaron reacciones cruzadas (>64000) para ovino, cabra, bovino, llama y muflón. El a-Igc-C se aplicó en ELISA-PPA utilizando un ciervo infectado y se evaluaron 215 sueros más provenientes de un campo de cría sospechoso. En paralelo, se los analizaron por IDAG (OIE 2014). En la prueba de ELISA-PPA, 11 de los 215 (5%) arrojaron valores considerados positivos, en cambio por IDAG todos los sueros evaluados fueron negativos. Resta confirmar la infección de los ciervos por identificación de MAP en cultivo de MF para el cálculo de sensibilidad y especificidad del PPA-ELISA desarrollado. Hemos obtenido un reactivo útil para el diagnóstico de enfermedades en ciervos que permitirá sustituir los reactivos importados y abaratar costos.

27- Estudio serológico de paratuberculosis en jabalí (*Sus Scrofa*) y ciervo axis (*Axis axis*) de la Argentina

Colombatti Olivieri, MA¹; Griffa, N¹; Cuerda, X¹; Abate, S²; Winter, M²; Martinez Vivot, M³; Barandiarán, S³; Romano, MI¹.

¹Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.

²CIT-RIO NEGRO, Sede Atlántica, Universidad de Río Negro (UNRN), Río Negro, Argentina.

³Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Cs. Veterinarias (UBA), Buenos Aires, Argentina.

La paratuberculosis es una enfermedad crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) que produce enteritis granulomatosa. Se han descrito en multitud de hospedadores, pero ésta afecta principalmente a rumiantes (bisonte, cabra, ciervo, oveja, vaca y otros no domésticos) aunque también se ha aislado en otras especies como caballos, cerdos, jabalí, mulas, lepóridos (liebre, conejo), perros, pollos y primates. En Argentina, existe escasa información sobre enfermedades que afectan a los animales silvestres y no se conoce con certeza el rol epidemiológico en la transmisión de infecciones de estos animales al hombre, a los animales domésticos y a la fauna nativa. En el caso puntual de la paratuberculosis solo se describió en ciervos (*Axis axis*), bovinos, ovinos y llamas de la Argentina; y el jabalí (*Sus scrofa*) es un importante reservorio de la enfermedad en España. *Map* pertenece al complejo *Mycobacterium avium*. Este complejo comprende bacterias que pueden encontrarse en el ambiente (agua, suelo). Por esa razón los animales pueden sensibilizarse a estas bacterias y presentar anticuerpos contra ellas. Las pruebas serológicas, como la técnica de ELISA, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en los animales silvestres son muy utilizadas ya que la muestra de suero es fácil de obtener y requiere de una única captura del animal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar con un ELISA que se utiliza para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, sueros de jabalíes y ciervos, con el objeto de determinar si estas especies pueden actuar como reservorio, pudiendo transmitir la infección al ganado doméstico. Se utilizaron 160 sueros de jabalí (n=128) y de

ciervo (n=32) para la detección de anticuerpos contra *Map* por la técnica de ELISA. Se utilizó el antígeno comercial PPA-3 (Allied Monitor Inc.) el cual fue absorbido en placas de ELISA Nunc MaxiSorp de 96 pocillos. El suero se usó en una dilución 1/50, sembrado por duplicado, y como sistema de revelado se utilizó la Proteína G (de *Streptococcus* spp.) conjugada a HRP (Sigma®) con ABTS. Se realizó la lectura de la densidad óptica a $\lambda=405\text{nm}$. Como no contamos con controles de sueros de jabalí y ciervo, positivos y negativos confirmados, se utilizaron como controles sueros de bovinos. El 10% de los sueros evaluados (2 ciervos y 15 jabalíes) dieron valores de OD_{405nm} similares o superiores al control positivo utilizado. La presencia de sueros reactivos al antígeno protoplasmático de *Map* (PPA-3) no es un indicador suficiente, en animales silvestres, para confirmar infección por *Map* ya que pueden dar falsos positivos (por anticuerpos no específicos) debido a que el antígeno puede cruzar con otras *Micobacterias* del complejo *M. avium*, ambientales o inclusive en animales infectados con *M. bovis*. Una forma de aumentar la especificidad del ELISA sería pre-absorber los sueros con *M. phlei* pero igualmente deberíamos contar con el aislamiento bacteriológico o PCR para poder validar la técnica de ELISA. Sin embargo la presencia de reactores promueve a continuar con el estudio en un número mayor de animales silvestres, y sumar diferentes especies, para poner a punto un ELISA que nos permita evaluar la seroprevalencia y el posible rol epidemiológico de la fauna silvestre en el mantenimiento y transmisión de la paratuberculosis.

28- Inmunodetección de células productoras de somatostatina en estómago de cerdos con diagnóstico de gastritis aguda provocadas por *Helicobacter* spp

Van Deer Veen P^{1*}, De Benedetti A¹, Grosso C¹, Gimenez S¹, Maine Soria E¹, Islas M¹, Sagripanti G¹, Machuca L¹, Bonino F¹, Martínez R¹, Navarro O¹, Mac Loughlin V¹.

¹ Cátedra de Histología- Facultad de Agronomía y Veterinaria- Universidad Nacional de Río Cuarto-Ruta 36 Km 601-Río Cuarto. Córdoba. Argentina.

* mariapaulavdv@gmail.com

El *Helicobacter* spp, es un microorganismo Gram negativo que se aloja en la mucosa gástrica y es considerado la principal causa de úlcera péptica. Estudios realizados confirman la implicancia del *Helicobacter* spp en patologías gástricas del hombre y otras especies animales, una de ellas el cerdo. El *Helicobacter* altera el control inhibitorio de la liberación de gastrina y esto resulta en una excesiva secreción ácida provocando úlceras pépticas. La secreción de ácido gástrico es controlada principalmente por la hormona gastrina, la cual es sintetizada en la mucosa estomacal. La secreción de estas células está regulada por la hormona somatostatina secretada por las células D. En el presente trabajo se estudió la relación entre *Helicobacter* spp y la funcionalidad de las células productoras de somatostatina en muestras gástricas de cerdos. Se tomaron muestras de tejido gástrico de la región antral de cerdos provenientes de frigoríficos de zonas aledañas a Río Cuarto (Córdoba), las mismas

fueron sometidas a la técnica histológica convencional. Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina (H/E) para el análisis histopatológico. Giemsa y Warthin Starry para la detección de *Helicobacter* spp. También se realizó inmunohistoquímica para la detección de *Helicobacter* spp y de células D. Las muestras analizadas fueron clasificadas como gastritis agudas *Helicobacter* (+/-), gastritis crónicas *Helicobacter* (+/-) y mucosa normal (control negativo). Se determinó el porcentaje de células D en las muestras con gastritis agudas *Helicobacter* (+) y (-). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) entre los grupos estudiados. Estos resultados preliminares indican que la disminución de somatostatina solo se refiere a su concentración y no al número de células que la producen como sugieren algunos investigadores.

29- Concentración de IFN- γ en suero y placenta porcina

Vélez C^{1*}, Williamson D¹, Garro A¹, Clauzure M², Gastaldo K¹, Soler J¹, Alderete S¹, Marrón Y¹, Viglierchio M¹, Koncurat M¹.

¹FCV- UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina;
²BIOMED-UCA, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.

*karovel@yahoo.com.ar

Para que la gestación se lleve a cabo, el diálogo que se establece entre el *conceptus* y el endometrio involucra una amplia variedad de citoquinas que se expresan tanto a nivel sérico como placentario. Se postula que estas moléculas inmunoregulatorias serían las responsables de determinar el tipo de respuesta inmune que se establece durante la gestación y permite una preñez exitosa. La placenta porcina es de tipo epiteliocorial y no invasiva. El IFN- γ es una citoquina proinflamatoria (Th1) producida principalmente por linfocitos estimulados, también es sintetizada en las células del trofoblasto de cerdos y podría ser efector directo de la despolarización de la membrana apical del epitelio endometrial. Esto daría como resultado la remodelación parcial o profunda de este tejido materno, condición necesaria para la implantación de los embriones. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los niveles de IFN- γ en Suero y Homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y fetal (HoPF) provenientes de diferentes períodos gestacionales. Se utilizaron (n=25) muestras séricas y placentarias de cerdas mestizas de \pm 17, 30, 60, 70, 114 días de gestación (dg) y de útero no gestante

(n=5). La determinación de IFN- γ se realizó por ELISA de captura utilizando kits comerciales específicos de especie. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y test de Tukey. Se halló presencia de IFN- γ durante la gestación porcina a nivel tisular. Presentó un pico de concentración en HoPM y HoPF a los 17 dg (12924,78 pg/ml y 4113,07 pg/ml, respectivamente), disminuyendo significativamente a los 30, 60, 70 dg y a término (p=0,0001). En suero, las concentraciones de IFN- γ , en general, fueron más bajas que en placenta; sin embargo esta citoquina se halló elevada significativamente a los 60 dg (84,64 pg/ml) en comparación con sus valores séricos a los 17 y 114 dg (11,52 pg/ml y 16,59 pg/ml, respectivamente; p=0,0054). En conclusión, la presencia elevada de IFN- γ en la interfase feto-materna a los 17 dg postulamos que permitiría los eventos moleculares que se establecen entre el endometrio y el trofoblasto para completar una correcta implantación. El pico de concentración en suero a los 60 dg cumpliría un rol crucial proinflamatorio, coincidente con la mayor remodelación de la estructura placentaria que acontece, por apoptosis, entre los 60 y 80 dg en esta especie.

30- El diagnóstico serológico en un modelo de Síndrome de Aborto Bovino

Casasnovas, G^{1,2}; Maffrand, C^{2,3}; Rossi, S²; Casasnovas, F²; Boyero, Y²; Bruno, MS²; Mortola, E^{4*}

¹ Estudiante de posgrado de la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, UNLP;

² Laboratorio Maffrand, Córdoba;

³ Cátedra de Análisis Clínicos, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC;

⁴ Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*mortola@fcv.unlp.edu.ar

El síndrome de aborto bovino (SAB) es un desafío desde el punto de vista diagnóstico. Su análisis en busca de un agente causal es fundamental, aunque las probabilidades de éxito no son altas. El diagnóstico serológico es una herramienta fundamental para los veterinarios clínicos que apoya sus conocimientos en busca de una resolución al problema. El objetivo de este trabajo fue resaltar el valor del diagnóstico serológico como herramienta en un modelo de SAB. Se aplicaron las siguientes pruebas: antígeno bufferado en placa y fluorescencia polarizada para Brucelosis, inmunofluorescencia indirecta para Neosporosis, microaglutinación en suero e inmunofluorescencia directa en orina para Leptospirosis, ELISA indirecto para el virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), ELISA de bloqueo para el virus de la diarrea viral bovina (DVB), observación directa para Trichomoniasis e inmunofluorescencia directa para Campylobacteriosis. Las muestras procedieron de un establecimiento de producción láctea de la provincia de Córdoba, donde se registraron 33 abortos y fueron procesadas por el Laboratorio Maffrand, Córdoba, quien recibió en un primer protocolo, las muestras de sangre pertenecientes a 18 hembras (8 abortadas y 10 no abortadas). Posteriormente, a los cuatro días, en un segundo protocolo se recibió un feto abortado de 6 meses de gestación y muestras de sangre y orina de cinco vacas abortadas. En el primer protocolo se realizó el diagnóstico de SAB. Para el segundo protocolo (ya conociendo los resultados del primero) se realizó la determinación de Leptospirosis en sangre y orina, Neospora en suero y la necropsia al feto. En el primer protocolo todos los animales fueron negativos a Brucelosis. En el caso de leptospirosis 14/18 animales presentaron títulos altos frente a *Leptospira pomona* (≥ 3200), y 4/14 muestras reaccionaron frente a otros serovares, posiblemente debido a la existencia de reacciones cruzadas. El títulos a *L. pomona* puede ser indicativo de infección reciente si se acompañan con signos clínicos de la infección. Los resultados de Neosporosis demostraron que 6/18 vacas poseen anticuerpos frente a *Neospora caninum* ($\geq 1/1200$), que deben interpretarse con

cautela, ya que pueden deberse a infecciones pasadas o tratarse de un rodeo endémico. La determinación de IBR demostró que 3/18 animales presentan resultados positivos frente al virus y 1/18 es sospechoso, los mismos podrían deberse a contacto previos con el agente. No hay sospecha de anticuerpos vacunales, ya que en el establecimiento no se realizan vacunaciones frente a enfermedades reproductivas. Para DVB se observa que 16/18 animales presentaron anticuerpos y 4/16 fueron considerados como positivos altos. Al igual que en IBR, muchos rodeos son serológicamente positivos a DVB, sin que esto signifique actividad viral. El diagnóstico de Trichomoniasis y Campylobacteriosis no se realizó debido a que las muestras no eran las adecuadas. Por los resultados obtenidos, podemos inferir que se trató de un caso de Leptospirosis o Neosporosis. De todas formas, en ninguna de las dos patologías se pudo realizar la determinación directa del agente. En las muestras del segundo protocolo no se detectaron muestras positivas a neospora, pero 5/5 animales presentan anticuerpos séricos frente *L. pomona* (1/1600), y también en los líquidos de cavidad abdominal (1/1600) y torácica (1/3200) fetales. Asimismo, resultados positivos a *Leptospira* spp en orina. El diagnóstico de trichomoniasis y campylobacteriosis fue negativo.

De los resultados obtenidos podemos considerar a la leptospirosis como causa del síndrome de aborto en estudio. El tratamiento terapéuticamente contra la enfermedad, contribuyó de manera significativa a la solución del problema. En ambas patologías (Neosporosis y Leptospirosis) hubiese sido importante poder realizar muestreos pareados para observar seroconversión, pero por cuestiones operativas del establecimiento esto no fue posible. El caso planteado demuestra que el diagnóstico serológico es una herramienta fundamental con la que cuenta el veterinario de campo. La observación y capacidad de relacionar los datos clínicos y epidemiológicos con los resultados serológicos y entender la dinámica de las enfermedades es fundamental para afrontar casos de abortos en bovinos.

31- Adaptación del virus rábico de desafío a cultivos celulares in vitro

Scian R^{1*}, Sanz MN¹, Guinzburg M¹, Cardillo S¹.

¹ Biogénesis Bagó S.A., Garín, Buenos Aires, Argentina.

*Romina.Scian@biogenesisbago.com

La técnica gold standard para la evaluación de la potencia de vacunas antirrábicas actualmente es la técnica NIH (desarrollado por el National Institutes of Health), la cual involucra la inyección intra-cerebral del virus rábico de una gran cantidad de animales de laboratorio inmunizados previamente con la vacuna a ensayar. Además de inducir el sufrimiento animal y constituir un riesgo para el operador, dicha técnica posee una baja precisión y reproducibilidad. La prueba de potencia alternativa (PPA) para vacunas antirrábicas constituye una mejora en cuanto a la cantidad de animales utilizados, el bienestar animal y la reproducibilidad del método. En esta técnica los ratones son inmunizados con la vacuna a ensayar y los sueros de los animales vacunados son enfrentados a la cepa viral de desafío con el objetivo de determinar la infectividad residual en cultivo de células por medio de la técnica RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test). El virus de desafío denominado CVS (Challenge Virus Standard) utilizado para la prueba NIH es mantenido mediante pasajes en cerebro de ratón, por lo que es necesaria su adaptación a células en cultivo previo a la implementación de la técnica de RFFIT. Existen antecedentes que demuestran que el virus CVS puede ser adaptado para la infección de células BHK-21, pero la información disponible acerca del procedimiento es escasa. Con el objetivo final de generar un stock de virus CVS para su utilización en la PPA, en primer lugar, se buscó adaptar la cepa viral a la infección de la línea celular BHK-21. En segundo lugar, se realizó una cinética de infección para determinar el tiempo óptimo para la cosecha del virus adaptado luego de la infección. Para llevar a cabo este objetivo las células adherentes BHK-21 fueron infectadas en suspensión con el virus CVS y se dejaron adherir a 37°C y una atmósfera de 5% CO₂. Luego de 4-5 días las células fueron tripsinizadas y re infectadas con el sobrenadante de cultivo del pasaje anterior hasta alcanzar un total de 10

pasajes. Una vez finalizado el ensayo se determinó el título viral en todas las cosechas. Además, los sobrenadantes cosechados en cada pasaje se utilizaron para infectar células y revelar la presencia de focos de infección por inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que los títulos aumentan y se mantienen hasta el pasaje 3 (de 2,3 a 4,3 log DICT50/mL), luego caen a partir del cuarto pasaje alcanzando su mínimo en el pasaje 6 (2 log DICT50/mL) y vuelven a aumentar a partir del séptimo pasaje, alcanzando su máximo en los pasajes 8 y 9 (4,5 log DICT50/mL). Por otra parte, se observó que a partir del pasaje 7 también aumentó la cantidad de células infectadas. Para llevar a cabo la cinética de infección se infectaron células BHK-21 con el virus cosechado en el pasaje 8 del ensayo de adaptación, por ser el que mostró el título y porcentaje de células máximos con el menor número de pasajes. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinó el título viral en cada uno de ellos. Para poder evaluar el porcentaje de células infectadas las mismas se plaquearon sobre cubreobjetos. Los resultados mostraron que a las 24 h pi. se produjo un aumento en el título viral con respecto al título inicial (de 3,8 a 4,7 log DICT50/mL), sin embargo la cantidad de células infectadas fue baja. A las 48 h pi. se observó el valor máximo de título viral (5,4 DICT50/mL) y un aumento en el número de focos fluorescentes; sin embargo, a las 72 h pi. se observó un drástico aumento en el número de focos y un título similar al observado a las 48 h. En este trabajo se describe una metodología para la adaptación del virus CVS a la infección de células BHK-21, mediante el repique sucesivo de células infectadas utilizando tripsina. Dicha adaptación se logró a partir del pasaje 7. Por otro lado, se concluyó que el tiempo óptimo en el que se observa el máximo valor de título viral en el sobrenadante y un mayor porcentaje de células infectadas es de 72 h.

32- Desarrollo y aplicación de una técnica PCR-BIO-ELISA para la detección de *Mycobacterium bovis*

Soutullo, A.¹; Fabiano, S.²; Cislachi, A.P.³; Cámara, M.S.⁴; Canal, A.M.⁵

^{1,3}Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de la Producción de Santa Fe, Argentina,

²Laboratorio de Sensores y Biosensores, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL,

⁴Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe,

⁵Laboratorio de Anatomopatología, Facultad de Cs Veterinarias, UNL, Santa Fe, Argentina.

*adrianasoutullo@gmail.com

La Tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial producida por la bacteria *Mycobacterium bovis*. En Argentina es una enfermedad endémica que afecta sobre todo al sector lechero. Las repercusiones económicas que esta infección ocasiona, el potencial zoonótico y las implicancias legales referidas al comercio, la convierten en uno de los principales desafíos de la sanidad animal. Así, resulta imperativo profundizar en el diagnóstico de esta enfermedad para contribuir a su control y erradicación. Si bien la prueba intradérmica de tuberculina (PPD) es la principal metodología diagnóstica, los actuales planes Nacional y Provincial de Control y Erradicación permiten implementar, como vigilancia epidemiológica, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del *M. bovis* en leche de tanque y/o tejidos decomisados en frigoríficos. Surge así la necesidad de disponer de herramientas diagnósticas complementarias, de mayor sensibilidad que la PCRIS6110 tradicional, con el propósito de detectar el *M. bovis* en muestras de leches y/o tejidos, aun con baja carga microbiana. A tal fin se extrajeron 143 ADN de leche de tanque y 43 de tejido parafinado. Las primeras fueron obtenidas por extracción con fenol:cloroformo:isoamilico y precipitación salina y las segundas mediante resina Chelex 100®. A partir del ADN se efectuó la amplificación de la secuencia génica de inserción IS6110 por PCR tradicional y para la PCR-BIO-ELISA se emplearon cebadores marcados con biotina (BIO) y digoxigenina (DIG). Así la BIO se une a la estreptavidina inmovilizada en la placa y la molécula de DIG, hibridada al otro extremo, es reconocida por un anticuerpo anti-DIG conjugado a una peroxidasa que cataliza una reacción de color, en presencia del *M. bovis*. La optimización de la PCR-BIO-ELISA se realizó por procedimientos de diseño experimental con el programa Design-Expert® Versión 10, evaluándose el efecto de los parámetros involucrados en cada una de ellas, PCR-BIO y

ELISA. Para validarla se establecieron sus características diagnósticas y analíticas, analizando 100 muestras de leche de tanque y 38 de tejidos embebidos en tacos de parafina. Los resultados fueron expresados como porcentaje de positividad y el valor de corte establecido mediante las curvas ROC, con el programa MedCal®. Para comparar la sensibilidad analítica respecto de la PCR tradicional, se realizó una curva de calibrado amplificando desde 0.2 fg a 10 ng de ADN del *M. bovis*. Las condiciones óptimas de la PCR-BIO fueron: concentración de oligonucleótidos de 3 ng/ μ L, 36 ciclos y una temperatura de hibridación de 68°C, en tanto el ELISA se realizó empleando un 2% (v/v) del producto de PCR-BIO; albúmina al 1% como agente bloqueante y 5 lavados en la última fase. El valor de corte calculado (0.324) permitió establecer una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 96,0% y 82,5%, respectivamente. Se obtuvo una sensibilidad analítica 25 veces superior a la PCR tradicional. Al comparar la performance de ambas PCRs con el diagnóstico de PPD en bovinos, obtuvimos resultados indeterminados en 6 tambos por PCRIS6110 (4 PPD+ y 2 PPD-), no obteniendo indeterminación con la PCR-BIO-ELISA. Por otro lado, en 23 tambos con animales PPD+, la PCRIS6110 fue positiva en el 56% y mayor (83%) con la PCR-BIO-ELISA. En 77 establecimientos sin animales reaccionantes a la PPD, el método tradicional logró detectar la presencia del *M. bovis* en el 30%, mientras que la PCR-BIO-ELISA en el 57%. Consideramos que nuestro objetivo inicial se ha cumplido exitosamente, al haber logrado mejorar aun más el diagnóstico mediante la PCR-BIO-ELISA, lo que nos permitió detectar los productos de amplificación sin estar sujeto a interpretaciones subjetivas por parte del operador y con una destacable mejora en la sensibilidad y especificidad respecto a la PCRIS6110 convencional. El presente desarrollo será la base para próximos desarrollos en el área de genosensores.

SESIÓN 3: INMUNOMODULACIÓN E INMUNOINTERVENCIÓN

33- Producción y caracterización de anticuerpos de yema de huevo (IgY) contra *Salmonella* ser. *Newport* de origen equino

Bustos CP^{1,2,3*}, Leiva LC^{1,2}, Guida N³, Chacana P¹

¹Instituto de Patobiología, CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; ³Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

*carlabustos@fvet.uba.ar / bustos.carla@inta.gob.ar

Argentina es uno de los países con mayor desarrollo de la producción hípica relacionada con la exportación de animales puros de raza y deportes ecuestres. Los cuadros de diarrea se ubican entre las patologías de mayor impacto en el equino y son motivo de extensas pérdidas económicas relacionadas con los costos de los tratamientos y la mortalidad. *Salmonella* es uno de los principales agentes productores de enterocolitis y cuadros diarreicos en equinos de todas las edades, describiéndose a las serovariedades Typhimurium, Newport, Anatum y Agona como las prevalentes a nivel mundial. En los últimos años se han aislado cepas multirresistentes de *Salmonella*, dificultando la terapéutica de la enfermedad y, por lo tanto, la búsqueda de alternativas es una temática emergente a nivel mundial. La Tecnología IgY se presenta como una opción prometedora para la prevención y el tratamiento específicos que disminuyan y/o reemplacen el empleo de antibióticos. La misma se basa en la producción de anticuerpos que se extraen de los huevos de gallinas ponedoras y pueden ser administrados por vía oral para inmunizar en forma pasiva a los animales tratados. Objetivos: producir y caracterizar anticuerpos de yema de huevo (IgY) contra *Salmonella* ser. *Newport* aislada de equinos. Luego del estudio de las cepas de *Salmonella* aisladas de equinos en la FCV-UBA, se seleccionó la cepa de *Salmonella* ser. *Newport* UBA 1293/16 como antígeno por obtenerse patrones electroforéticos similares a otras cepas aisladas de equinos y humanos en Argentina. La bacteria fue cultivada en medio líquido y posteriormente inactivada. Se ajustó su concentración al 1 MF y se emulsionó con adyuvante de Freund (AF) ó con un adyuvante de la línea Montanide® (M). Se llevó a cabo un plan de inmunización estandarizado y avalado por el CICUAE del CICVyA-INTA, empleando 2 gallinas para cada uno de los adyuvantes. La 1era inoculación se realizó con AF completo para ambos

grupos de gallinas, inoculando 0,25 mL s.c. y 0,25 mL i.m. Posteriormente y cada 2 semanas, se realizaron 4 inmunizaciones con AF incompleto y con M por vía i.m. Una semana luego de cada inmunización, se extrajo sangre a partir de la vena alar para evaluar el título específico contra *Salmonella* ser. *Newport* mediante microaglutinación lenta en placa de 96 pocillos. Se recolectaron los huevos y las inmunoglobulinas se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio. Se determinó la concentración de proteínas de los extractos mediante el método de Bradford y el título mediante microaglutinación. Además, se evaluó la actividad in vitro contra *Salmonella* mediante inhibición de crecimiento bacteriano en agar semisólido. Se obtuvieron resultados similares en los títulos de anticuerpos en ambos grupos. La hiperinmunización de los animales se alcanzó con la 4ta inoculación, con títulos de microaglutinación > 1:10240. Se obtuvieron extractos de yema de ambos grupos de gallinas post 3era, 4ta y 5ta inoculación con concentraciones proteicas que variaron entre 157,30 y 288,2 mg/mL y títulos específicos entre 1:10240 y 1:20480. Respecto a la actividad anti-*Salmonella* de los extractos, se observó inhibición específica del crecimiento bacteriano utilizando distintas diluciones de los mismos. Se logró producir anticuerpos IgY contra la serovariedad estudiada y los títulos fueron similares para ambos adyuvantes evaluados lo que indica la posibilidad de utilizar el adyuvante comercial para la producción de estas inmunoglobulinas. Los anticuerpos tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria. Futuros estudios deberían evaluar la eficacia de estos anticuerpos en modelos animales para determinar la factibilidad de desarrollo de productos basados en la Tecnología IgY destinados al control de la diarrea equina, tanto en forma profiláctica como terapéutica.

34- Producción y purificación de anticuerpos IgY en yema de huevo. Comparación de dos métodos

Porporatto, L.^{1*}; Gossweiler, B.¹; Pietronave, V.²; Lauría, D.³; Peirone, C¹.

¹Cátedra de Semiología y Análisis Clínicos, ²Cátedra de Inmunología, ³ Cátedra de Producción Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

*lautaroporporatto@hotmail.com

Los anticuerpos IgY, derivados de la yema de huevo de las aves, presentan ciertas características que los diferencian de los anticuerpos de origen mamífero, como ser su menor costo de producción y su mayor rendimiento. La producción de anticuerpos policlonales, generalmente en caballos, ovejas o conejos, requiere que los animales sean sangrados para su obtención. La utilización de gallinas y la recolección de sus huevos se presentan como una alternativa menos invasiva, obteniendo cantidades más altas de anticuerpos que en los mamíferos. Este procedimiento significa menor sufrimiento para los animales y mayor bienestar animal. Debido a la distancia filogenética que separa a las aves de los mamíferos, la IgY puede reconocer proteínas mamíferas altamente conservadas o péptidos poco inmunogénicos, produciendo una mayor respuesta inmune. Además, no presenta reacciones cruzadas con el factor reumatoideo o anticuerpos humanos anti-ratón, no activa el sistema de complemento mamífero, y presentan menores reacciones inespecíficas en inmunoensayos, reduciendo de esta manera los resultados falsos positivos. Todas estas ventajas la hacen un anticuerpo de elección para su uso en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de anticuerpos policlonales específicos derivados de yema de huevo y la evaluación de distintas técnicas para su purificación. Se inmunizaron 3 gallinas Leghorn de 30 semanas de edad a los 0, 15 y 20 días vía subcutánea, en la pechuga. El inóculo utilizado fue una mezcla de volúmenes iguales de antígeno (vacuna comercial contra parvo virus canino) con adyuvante incompleto de Freund (volumen final de 1 ml). Los huevos fueron recogidos a partir de los 15 días de la primera inoculación hasta el día 95; se identificaron con el número de la gallina correspondiente y la fecha de recolección, y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Para la

obtención de IgY se realizó la separación manual de la yema y de la clara. Las claras se descartaron y las yemas se colocaron en un erlenmeyer. Luego se les agregó el mismo volumen obtenido de yemas de PBS (1/1), homogeneizando bien la mezcla. El proceso de purificación de los anticuerpos IgY requiere una etapa de deslipidación y una etapa de precipitación. En la etapa de deslipidación se evaluaron dos métodos: utilización de 3.5% de polietilenglicol 6000 y dilución con una solución acuosa acidificada con ácido acético (pH final de la solución de 5). En la etapa de precipitación de la inmunoglobulina también se evaluaron dos métodos: precipitación con polietilenglicol 6000 al 12.5% y precipitación con sulfato de amonio saturado al 20%. La concentración de las proteínas extraídas de la yema de huevo fue determinada por el método de Bradford. En todas las técnicas utilizadas se evaluaron factibilidad, costos y producción. Ambos métodos de purificación resultaron ser económicos, de fácil realización, no siendo necesarios el uso de aparatos sofisticados ni personal altamente capacitado. El método de deslipidación con polietilenglicol 6000 resultó ser más eficaz que el método de dilución acuosa, ya permite una buena eliminación de los lípidos. En cuanto a los métodos de precipitación, el que utiliza sulfato de amonio resultó ser más eficaz recuperándose 8 mg de proteína/ ml de yema. Se puede concluir que el método de inmunización resultó de gran aplicabilidad para la obtención de IgY en yema de huevo; el protocolo mostró una producción de anticuerpos contra el parvovirus canino a partir de la segunda semana; sin embargo, se alcanzó una concentración máxima al día 50 aproximadamente. La metodología descrita es eficiente y económica, permite procesar un volumen considerable de yemas para obtener anticuerpos policlonales IgY contra parvovirus canino y puede ser utilizada a gran escala.

35- Caracterización de un aislamiento de *Mycobacterium bovis* altamente inmunopatogénico

Mercedes Bigi*¹, Ana Beatriz C Castelão*², Cristina Lourdes Vazquez³, Angel A Cataldi³, Mary Jackson⁴, Michael McNeil⁴, Marcelo Soria¹, Martín J Zumárraga³, Christiane Nishibe⁵, Nalvo F Almeida⁵, Flávio Ribeiro de Araújo⁶Ω, Fabiana Bigi³Ω.

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Cátedra de Microbiología Agrícola. INBA-CONICET. Buenos Aires, Argentina.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

³ Instituto de Biotecnología, CICVyA/INTA, Argentina.

⁴ Colorado State University, Dept. of Microbiology, Immunology and Pathology, USA.

⁵ Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁶ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina, una enfermedad infecciosa crónica que puede afectar al ganado bovino, otras especies domesticadas, animales salvajes y seres humanos. Esta enfermedad produce importantes pérdidas económicas a escala mundial. Se aislaron dos cepas de *M. bovis* en Argentina: la cepa 04-303 se aisló de un jabalí y la cepa 534 de ganado vacuno. En un estudio previo, la cepa 04-303 produjo 100% de mortalidad en ratones seis semanas después de la infección con altos niveles de daños histopatológicos debido a la exacerbada respuesta inmune que la cepa induce. Por el contrario, los ratones infectados con la cepa 534 sobrevivieron después de cuatro meses, con un daño tisular limitado. Con el objeto de conocer las bases moleculares de la exacerbada virulencia de 04-303, en este estudio se compararon todas las proteínas predictivas codificadas en los genomas de 04-303 y 534. Se emplearon programas de análisis comparativos de genomas completos y métodos bioquímicos y de espectrometría de masas para análisis de lípidos. También, se utilizó la microscopía confocal para el estudio

de la interacción de las cepas de *M. bovis* con el macrófago bovino. Este análisis comparativo reveló 139 proteínas polimórficas entre ambas cepas. Nueve y cinco proteínas de virulencia mostraron polimorfismos en 04-303 y 534 cepas, respectivamente. Sorprendentemente, detectamos un alto nivel de polimorfismo en proteínas relacionadas con la síntesis del lípido fitoceroldimicosato PDIM entre ambas cepas. Otras pruebas experimentales indicaron que sólo las mutaciones en 534 tienen un impacto en la síntesis de PDIM. La reducción observada en el contenido de PDIM en la cepa 534 junto con su baja capacidad para inducir el arresto de fagosomas, en este trabajo demostrada, puede estar asociada con la deficiencia de esta cepa para replicarse y sobrevivir dentro de los macrófagos bovinos. Los hallazgos de este estudio contribuyen a una mejor comprensión de los aspectos de la inmunopatogenicidad y virulencia de *M. bovis*, conocimiento esencial para futuros estudios dirigidos al desarrollo de nuevas vacunas y técnicas de diagnóstico en bovinos.

36- Interacción de BLV-MIR-B5-3P con genes involucrados en la respuesta inmune adaptativa del bovino

Carignano, H.A.^{1*}, Petersen, M.^{1,2}, González, D.D.^{1,2}, Jaworski, J.P.^{1,2}

¹ Instituto de Virología, CICVyA – INTA Castelar. De los Reseros y Las Cabañas s/n, B1686, Hurlingham, Buenos Aires.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1033AAJ, Buenos Aires.

*carignano.hugo@inta.gob.ar

El virus de la leucosis bovina (VLB) afecta al ganado bovino, provocando una infección persistente y asintomática. Sin embargo, la infección con VLB provoca un desbalance inmunológico, la aparición de infecciones secundarias y afectando la productividad de los animales. Por otra parte, un tercio de los animales infectados con VLB presentan un cuadro de linfocitosis y un 1 a 5% desarrolla linfosarcomas. Durante la infección con VLB, la respuesta inmune elimina eficientemente las células B que expresan antígenos virales. Sin embargo, el genoma viral continúa replicándose a partir de la mitosis de los linfocitos B (LB) que portan el provirus transcripcionalmente silenciado. Recientemente se ha descrito que el genoma del VLB codifica para una serie de ARNs no codificantes y se le ha a los mismos un rol esencial en el desarrollo de los procesos tumorigénico característicos de este virus. Los micro ARN (miRNA), son pequeños ARN (22 nucleótidos aprox.) sintetizados por la mayoría de células eucariotas y algunos virus, cuya función central es la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Dada su versatilidad, los miRNA codificados por VLB permitirían al virus modular diversos procesos celulares, incluyendo la evasión de la respuesta inmune del hospedador. Entre estos, BLV-miR-B5-3p tendría un rol importante en la patogenia viral, ya que su expresión se encuentra regulada por otra serie de ARN antisense codificados por el mismo virus. Recientemente, demostramos la capacidad de interacción de BLV-miR-B4-3p, con diversos genes bovinos. Por su parte, en el presente trabajo analizamos in silico la

capacidad de interacción de BLV-miR-B5-3p, con genes bovinos vinculados a la respuesta inmune adaptativa. Se seleccionó un set de 239 genes en base a su anotación de ontología génica (GO) adaptive immune response (GO:0002250) y se estableció su interacción con BLV-miR-B5-3p considerando la complementariedad de secuencias y la estabilidad termodinámica de la misma. Un total de 19 genes mostraron evidencia de interacción con BLV-miR-B5-3p (4 genes en su región 3' UTR, 17 en la secuencia codificante y 2 ambas regiones). La anotación funcional génica, mediante los términos del vocabulario Medical Subject Headings (MeSH), mostró que Immunity, Cellular (MeSH:D007111); Antibody Formation (MeSH:D000917); y Hybridization, Genetic (MeSH:D006824), entre otros, se encuentran significativamente sobrerrepresentados ($p < 0,01$) en este grupo de genes. Estos resultados demuestran el potencial que poseen los miRNAs codificados por VLB de interaccionar con genes que intervienen directa e indirectamente en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. El análisis de enriquecimiento en términos MeSH provee información adicional para interpretar el posible rol biológico de los genes influenciados por VLB-miRNAs. Este estudio constituye una base para la realización de análisis funcionales de la interacción entre los VLB miRNAs y genes del hospedador, lo que permitiría dilucidar mecanismos de la patogénesis de VLB.

37- Estudio comparativo de modelos experimentales para la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por inmunógenos contra alfa herpes virus equino 1

Piskorz, A.L.^{1*}; Rodriguez, S.²; Fuentealba, N.A.^{3,4}; Galosi, C.M.^{3,5}

¹DLA-DILAB-SENASA, Martinez, Bs As, Argentina;

²Dirección de Veterinaria y Bromatología, Ministerio de Seguridad de la Pcia de Bs As.;

³Cátedra de Virología- Facultad de Ciencias Veterinarias –Universidad Nacional de La Plata Buenos Aires. 60 y 118, La Plata, Bs As, Argentina;

⁴CCT-CONICET, La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. La Plata, Bs As, Argentina;

⁵Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, Bs As, Argentina.

*apiskorz@senasa.gob.ar

El Alphaherpesvirus equino 1 (EHV-1) afecta a los miembros de la familia *Equidae* y se encuentra distribuido en todo el mundo. La infección se manifiesta con sintomatología respiratoria (rinoneumonitis), nerviosa, abortos y síndrome neonatal que generalmente lleva a la muerte del potrillo en las primeras 48 horas de vida, ocasionando importantes bajas en los establecimientos de cría equina. El virus produce infecciones latentes y ante determinadas situaciones de estrés pueden reactivarse con o sin sintomatología manifiesta. La gravedad de los casos clínicos está relacionada con la patogenicidad y la virulencia de la cepa y el estado inmune de los animales. Los animales desarrollan anticuerpos ante la infección natural, pero esta respuesta es de corta duración, posibilitando que los equinos vuelvan a infectarse en sucesivas oportunidades. Las glicoproteínas virales que juegan un rol principal en la infectividad y virulencia son las principales inductoras de la respuesta inmune celular y humoral en el huésped. Para el control de la infección por EHV-1 existen en el mundo vacunas inactivadas, atenuadas y elaboradas por ingeniería genética, pero todas requieren numerosas dosis y la eficacia continúa siendo cuestionada, sumado a la falta de datos objetivos que avalen su calidad inmunogénica. La dificultad de contar con equinos seronegativos para EHV-1 y el elevado costo de las pruebas de inmunogenicidad en el hospedador natural, plantean la necesidad de utilizar animales de laboratorio como modelo, que permitan evaluar comparativamente la potencia de cada vacuna, garantizando la disponibilidad de productos eficaces y homogéneamente controlados. Teniendo en cuenta que el SENASA utiliza el modelo cobayo para la evaluación de vacunas para la prevención de enfermedades virales equinas, y que la cepa CF1 de ratón es utilizado como modelo experimental para la valoración de otras vacunas, el objetivo de este trabajo

fue comparar a ambos modelos en la evaluación de dos vacunas comerciales para EHV-1 y una glicoproteína D (gD) recombinante. Además se evaluó la respuesta inducida en equinos adultos utilizando los mismo inmunógenos. Se utilizaron dos vacunas comerciales y la gD recombinante producida en baculovirus y purificada por columnas de níquel. La gD se utilizó combinada con el adyuvante Montanide ISA 206. Se realizaron 2 inmunizaciones utilizando: a) vacunas comerciales, 0.05 ml en ratones, 0.5 ml en cobayos y la dosis recomendada por el fabricante para los equinos; b) gD recombinante con Montanide ISA 206, 15 µg de gD en 0,05 ml en ratones, 150 µg de gD en 0,5 ml para los cobayos y 500 µg de gD en 2 ml en equinos. Se sangraron los animales a los 15 días de cada inmunización en el caso de los animales de experimentación y a los 30 días a los equinos. Se obtuvo el suero de cada muestra y se analizaron por la técnica de virusneutralización, utilizando el método virus fijo suero variable. Tanto el cobayo como el ratón CF-1 no arrojaron resultados positivos en cuanto a la producción de anticuerpos con ninguno de los inmunógenos aplicados. En los equinos, ambos inmunógenos estimularon la producción de Ac y se produjo seroconversión entre la primera y segunda vacunación, observándose, un aumento superior en la inmunización con la gD recombinante. El hecho que el ratón CF-1 es una cepa exocriada podría ser la razón de ausencia de resultados positivos. Por el momento el ratón BALB/c (endocriado) usado corrientemente como modelo en EHV-1 continúa siendo el mejor modelo. Por primera vez se evaluó la respuesta inmune humoral ante la inmunización de equinos adultos con la gD y se comparó con las vacunas comerciales. De los resultados obtenidos se desprende la posibilidad continuar con los ensayos en equinos con la gD recombinante y estudiar otras cepas de ratones para la valoración de vacunas.

38- Efecto de la infección crónica por *Staphylococcus aureus* sobre parámetros inmunológicos y funcionalidad de los macrófagos aislados de secreciones mamarias bovinas

Renna MS^{1*}; Silvestrini P¹; Andreotti C¹; Lovato M¹; Baravalle C^{1,2}; Calvino L^{2,3}; Dallard B^{1,2}.

¹ Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

³ Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Rafaela, Santa Fe, Argentina.

* msrenna@fcv.unl.edu.ar

Staphylococcus aureus es el principal patógeno mayor de la glándula mamaria bovina en Argentina y el mundo y causa principalmente infecciones intramamarias (IIM) subclínicas y crónicas que no responden habitualmente a la terapia antibiótica y que generan importantes pérdidas económicas. Durante las IIM los macrófagos son indispensables para el reconocimiento y eliminación de las bacterias causantes de mastitis. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la infección crónica por *S. aureus* sobre parámetros inmunológicos y sobre la funcionalidad de las células mononucleares (CMN) aisladas de secreciones mamarias bovinas. Se utilizaron vacas en la etapa final de la lactancia con cuartos libres de infección y crónicamente infectados con *S. aureus*. Se estableció como día 0 el comienzo de la etapa de vaca seca y se tomaron muestras de secreción mamaria en diferentes periodos hasta el día 21 post secado (ps), para evaluar diversos componentes del sistema inmune. Entre los parámetros analizados, los niveles de lactoferrina fueron menores en secreciones mamarias de cuartos infectados con respecto a sanos al día 7, 14 y 21 ps ($p=0,01$). La concentración de nitritos se vio influenciada por la IIM ($p=0,041$) observándose una disminución en secreciones de cuartos infectados con respecto a sanos a las 72 h y al día 7 ps ($p<0,05$ y $p<0,001$). Los niveles de IgG total fueron menores en secreciones de cuartos infectados con respecto a sanos a los 7 ($p<0,01$), 14 y 21 días ps ($p<0,001$). Por otro lado, se aislaron CMN de secreciones mamarias de cuartos provenientes de ambos grupos de animales, y se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células que expresaban CD14. En secreciones mamarias de animales infectados, el mayor número de células CD14+ se observó al día 14 y fue mayor al observado al día 7 ($p<0,05$), mientras que

en secreciones de animales controles no se observaron diferencias significativas. Cuando se enfrentaron *in vitro* CMN provenientes de secreciones mamarias de ambos grupos de animales con *S. aureus* marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), los niveles de nitritos fueron mayores en CMN de cuartos infectados comparados con controles al día 7 y 14 ps ($p=0,004$, $p=0,032$). Cuando se evaluó el porcentaje de CMN asociadas al menos con una bacteria (ya sea adherida o internalizada), no se observaron diferencias entre ambos grupos ($p=0,77$). Por último, se evaluó por citometría de flujo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en CMN positivas para FITC (que al menos estuvieron asociadas con una bacteria). Se observó que la intensidad de fluorescencia media (IFM) fue mayor en CMN provenientes de cuartos infectados con respecto a sanos al día 14 ps ($p=0,023$), no así durante los días 7 y 21 ps, donde la IFM fue similar. En base a los resultados obtenidos, se concluye que la infección crónica por *S. aureus* indujo una disminución en los niveles de lactoferrina, de nitritos (durante la primera semana del período de secado) y de IgG total en secreciones mamarias durante la involución activa. Por el contrario, las CMN aisladas de secreciones de cuartos infectados fueron capaces de producir mayores niveles de nitritos y de ROS (IFM) en respuesta al contacto *in vitro* con *S. aureus*. Estos resultados indicarían que la respuesta inmune que se desencadena en la glándula mamaria bovina en respuesta a la infección crónica por *S. aureus*, es insuficiente para erradicar la bacteria, logrando evadir los mecanismos de defensa del hospedador para persistir en el tejido durante el proceso de involución activa.

39- Evaluación Clínica de terneras Hereford de un año de edad inmunomoduladas con Lipoarabinomananos

Alvarez, G.^{1*}; Fernandez E.¹, Colavecchia S.²; Mundo S.²

¹Cátedra de Clínica Médica y Quirúrgica en Ruminantes FCV – UBA. CABA. Argentina.

²Cátedra de Inmunología FCV – UBA. CABA. Argentina.

guadialvarez@yahoo.com.ar

La inmunomodulación, produce un efecto no solo sobre la respuesta inmune, sino sobre las variables fisiológicas de los individuos. Estos efectos se evidencian con el examen clínico pudiendo ser abonado por métodos complementarios. Los lipoarabinomananos (LAM) de las paredes celulares de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) poseen un efecto inmunomodulador en bovinos aumentando la respuesta inmune innata (estallido respiratorio de Macrófagos) y la respuesta inmune celular. La respuesta inmune humoral se ve disminuida (IgG2). El objetivo fue evaluar clínicamente a terneras Hereford de 1 año de edad inmunomoduladas con LAM de MAP. Se utilizaron 14 terneras Hereford de 1 año de edad. Se formaron 4 grupos según: Grupo I: n=3 (control negativo) con PBS + AFI. Grupo II: n=4 con OVA (1mg/ml) + AFI. Grupo III: n=5 con OVA (1mg/ml) + LAM 2mg/ml + AFI. Grupo IV: n=2 con LAM 2mg/ml + AFI. Se realizaron 3 inoculaciones por grupo cada 21 días, realizando pre-inoculación la evaluación clínica, hematológica, bioquímica, coproparasitológica y serológica de anticuerpos vacunales contra Brucelosis. A las 24 h post inoculación se evaluó la clínica, hematología y bioquímica de todos los individuos. A las 72 h post inoculación se realizó nuevamente el examen clínico y el análisis coproparasitológico. La FC, FR y la T°C no difirieron entre los grupos. Los tres parámetros aumentaban a las 24 h post inoculación para volver a sus valores iniciales pre inoculación a las 72 h, considerándose estas modificaciones propias de una respuesta de fase aguda. Para la ganancia de peso diaria no hubo diferencias entre grupos pero sí a lo largo del ensayo. En los parámetros hematológicos tampoco hubo diferencia entre grupos. Se evidenció un efecto post-inoculación produciendo una disminución de GR, aumento de hemoglobina, aumento de plaquetas, aumento del VCM, aumento HCM y disminución CHCM. Este cuadro hematológico es coincidente con una respuesta inflamatoria al inóculo, generando mediadores de la inflamación con inhibición de la eritropoyesis, por lo

que en una primera instancia se produce una anemia por inflamación para luego ser compensada con aumento de la eritropoyetina que estimula la eritropoyesis medular. Los neutrófilos disminuyeron y linfocitos aumentaron post inoculación, debido a que los adyuvantes incrementan la inflamación local por lo que se genera una proliferación de linfocitos no específicos. La persistencia del antígeno genera el reclutamiento celular de la respuesta innata. Los parámetros de bioquímica sérica permanecieron sin diferencias entre los grupos experimentales pero si se evidenció un efecto post-inoculación donde aumentaron las enzimas hepáticas compatible con la respuesta de fase aguda. Las albúminas tendieron también disminuir (proteínas totales de valor normal) indicando un aumento de las globulinas relacionado a la síntesis de proteínas de fase aguda post-inoculación. Con respecto a la carga parasitaria la aplicación de los diferentes tratamientos no ejerció efecto alguno pero se observó una modificación en el recuento de huevos asociada al ciclo biológico de estos nematodos cada 21 días. Los títulos de anticuerpos vacunales concuerdan con los esperados para hembras de 1 año que fueron vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad. No hubo diferencias entre grupos por lo que LAM no modificó la respuesta inmune contra la vacuna. Sobre la respuesta clínica, hematológica, bioquímica, coproparasitológica y serológica en bovinos inoculados o no con LAM, se pudo concluir que el LAM inoculado como formulación junto con AFI a bovinos vacunados con OVA: No modifica los parámetros clínicos, hematológicos ni bioquímicos, solo genera una respuesta inflamatoria como la que produce AFI únicamente; no modifica la carga parasitaria, por lo que la disminución de la respuesta inmune humoral no genera una aumento de las poblaciones de nematodos, no interfiere con la respuesta inmune humoral generada por la vacuna de *Brucella abortus*.

40- Efecto en la salud y desarrollo de terneros alimentados con leche de descarte adicionada con prebióticos y el impacto de la falla de transferencia de inmunidad pasiva

Alvarez, G^{1*}; Moscuza CH¹; Gutierrez BA¹; Tropeano M¹; Zurita M¹

¹Catedra de Clínica Médica y Quirúrgica en Rumiantes. FCV – UBA.

guadialvarez@yahoo.com.ar

La leche de descarte es aquella no destinada al consumo humano por poseer drogas de uso veterinario o microorganismos patógenos. Su uso para la alimentación de terneros durante la crianza artificial (CA) es frecuente. Se conoce el impacto negativo de su consumo en la salud de los animales, haciéndolos más susceptibles a enfermedades, donde las más prevalentes son de origen infeccioso (diarrea, neumonía y onfalitis). Esto conduce al uso de grandes cantidades de antimicrobianos (ATM) generando bacterias resistentes a los mismos. Las prácticas vinculadas a mejorar el estatus inmunológico en terneros permiten que la prevalencia, duración y severidad de las enfermedades sea menor; reduciendo el uso de ATM. La transferencia de inmunidad pasiva a través del calostro y el uso de prebióticos (que estimulan la inmunidad en mucosas) durante la CA en terneros, fortalecen la salud de los animales, disminuyendo la morbilidad y mortalidad de las enfermedades y por tanto el uso de ATM. El objetivo del trabajo fue evaluar la salud de terneros de tambo alimentados con leche de descarte adicionada o no con prebióticos y el efecto sobre ella del nivel de transferencia de inmunidad pasiva. En el ensayo 1 se evaluó el efecto sobre la salud del nivel de inmunidad pasiva a través del calostro de terneros alimentados con leche de descarte. Se utilizaron 9 terneros en CA; 3 con falla de la transferencia de inmunidad pasiva (FTP) y 6 con transferencia de inmunidad pasiva efectiva (TPe). Se procedió a la evaluación clínica, hematológica y de bioquímica sérica a lo largo de la CA. En el ensayo 2 se evaluó el efecto sobre la salud de la adición de prebióticos a la leche de descarte. Se utilizaron 14 terneros con TPe, alimentados con leche de descarte adicionada (GE: Grupo Experimental, n=8) o no (GC: Grupo Control, n=6) con prebióticos (MOS, manano-oligosacárido de *Sacharomyces sp.*). Se procedió a la evaluación clínica, hematológica, bioquímica sérica y de crecimiento y desarrollo (ecografía de pared ruminal e intestinal, *Longissimus dorsi*, región glútea y

medidas bovinométricas) a lo largo de la CA. Los resultados del ensayo 1 arrojaron que aquellos terneros con FTP padecían cuadros de diarrea (aumento de la temperatura corporal, de la FC, de la FR, heces líquidas o pastosas, fétidas, presencia de gas intestinal y deshidratación) que comenzaba a menor edad, su duración era mayor al igual que su severidad en comparación con aquellos con TPe (Curvas de Kaplan – Meyer; p<0,05). La fórmula leucocitaria (neutropenia y linfopenia) presente en el grupo FTP fue compatible con el cuadro entérico, la uremia también fue mayor debido a la deshidratación. Las proteínas totales fueron menores en los terneros con FTP (albúmina de valor normal) debido a la falla de transferencia de inmunidad pasiva (inmunoglobulinas). En el ensayo 2, aquellos del GE alcanzaron pesos superiores que el GC. El desarrollo de la pared ruminal e intestinal medidos ecográficamente fue superior en GE; al igual que el desarrollo muscular del *Longissimus dorsi* y de la región de la cadera. Las medidas bovinométricas también fueron superiores en estos últimos. La diarrea evaluada clínicamente, resultó más prolongada y severa en el GC, con recuentos de leucocitos (GE: 9000 ± 840,6; GC: 6783,8 ± 1099,2) y de neutrófilos segmentados (GE: 4111,6 ± 702,1; GC: 1418 ± 180,7) menores a los esperados, común de los cuadros entéricos. La urea fue mayor en el control (GE: 35,9 ± 4,1; GC: 50,8 ± 10,7) debido al estado de deshidratación generado por diarrea. Se puede concluir que la FTP predispone a los terneros alimentados con leche de descarte a padecer enfermedades de mayor durabilidad y severidad. En aquellos animales con TPe que fueron alimentados con leche de descarte adicionado con prebióticos tuvieron menor prevalencia de diarrea y su evolución resultó más benigna que en aquellos que no recibieron prebiótico. También mostraron mayor crecimiento y desarrollo de su sistema digestivo y masa muscular.

41- Efectos benéficos de *L. rhamnosus* RC007 en modelos de inflamación intestinal

García, G.^{1,2}, Dogi C.^{1,2}, de Moreno A.^{2,3}, Cavaglieri L.^{1,2}, Greco C.¹

¹ Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 km.601. (5800) Río Cuarto, Córdoba. Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina.

³ Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Chacabuco 145. (T4000ILC) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

ggarcia@exa.unrc.edu.ar

En los sistemas productivos porcinos, el destete es un período clave caracterizado por inflamación intestinal y desbalances microbianos, con la consecuente aparición de diarreas. Además, en el postdestete los animales comienzan a alimentarse con dieta sólida, en la cual están presentes las micotoxinas. En los últimos años, la utilización de probióticos como aditivos alimentarios es ampliamente utilizada para estimular la salud intestinal de los cerdos en el postdestete. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de *L. rhamnosus* RC007 frente a dos agentes productores de inflamación intestinal, uno biológico con la micotoxina deoxinivalenol (DON) y uno químico con 2,4,6-acidotrinitrobenzensulfónico (TNBS), en un modelo *ex vivo* de explantos intestinales y un modelo *in vivo* en ratón, respectivamente. En el modelo de inflamación producido por DON, se utilizaron explantos de yeyuno de cerdos de 5 semanas de edad. Los tratamientos evaluados fueron: 1) explantos con medio William's E. (control) durante 3h, 2) explantos expuestos durante 3h a DON (10 µM), 3) explantos con *L. rhamnosus* RC007 (10⁹ UFC/ml) durante 3h, 4) explantos pre-incubados 1h con *L. rhamnosus* RC007 (10⁹ UFC/ml) y luego expuestos durante 3h a DON (10 µM). Se extrajo el RNA y se realizó qPCR para la determinación de IL-1β, IL-8 e IL-22. Se midió la permeabilidad celular en cámara Ussing. En el modelo de inflamación producido por TNBS, se utilizaron ratones machos BALB/c. Los tratamientos fueron: 1) Grupo Control (Control sin inflamación): 6 ratones alimentados con dieta convencional suplementada con PBS 10 días consecutivos y con inoculación intrarrectal de PBS-etanol (vehículo de la droga TNBS) el día 10 del experimento (Sin TNBS), 2) Grupo TNBS (Control con inflamación): 6 ratones

alimentados con dieta convencional suplementada con PBS10 días consecutivos y con inoculación intrarrectal de TNBS (disuelta en PBS-etanol) el día 10 del experimento 3) Grupo *L. rhamnosus* RC007-TNBS: 6 ratones alimentados con dieta convencional suplementada con *L. rhamnosus* RC007 (10⁸ UFC/ml) 10 días consecutivos y con inoculación intrarrectal de TNBS (disuelta en PBS-etanol) el día 10 del experimento. El sacrificio de los animales se realizó el día 14 del experimento. Se evaluó el peso de los animales, el índice de daño micro/macrocópico en intestino, la translocación microbiana a hígado y MCP-1, TNFα, IL-12 e IL10 en fluido intestinal por citometría de flujo. Los resultados del modelo *ex vivo* mostraron que la preincubación con *L. rhamnosus* RC007 redujo la toxicidad producida por DON a través de la disminución de la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-8, IL-22 y de la disminución de la permeabilidad paracelular. Con respecto al modelo *in vivo*, los ratones que recibieron *L. rhamnosus* RC007 comenzaron a recuperar antes el peso corporal, lo cual se relaciona con menor daño micro/macrocópico en intestino y consecuentemente disminución de la translocación microbiana producida por la inflamación. Además, el perfil de citoquinas estudiado indicó que un aumento de la relación IL-10/TNFα mostrando un potencial efecto antiinflamatorio de la administración de la bacteria láctica. En conclusión, *L. rhamnosus* RC007 tiene la capacidad de modular la respuesta inmune frente a un estado de inflamación, mejorando así la homeostasis intestinal y en consecuencia podría aumentar los índices productivos. Estos y resultados previos demuestran que esta cepa tiene potencial para formular un aditivo alimentario novedoso destinado a mejorar la producción animal.

42- El tratamiento del calostro bovino con ozono reduce la carga de bacterias mesófilas, sin afectar el título de anticuerpos seroneutralizantes frente al virus de la Diarrea vírica bovina

Dunleavy M.V.^{1*}, Vilte D.A.¹, Mundo S.², Morris W.E.¹.

¹Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar.

²Cátedra de Inmunología, Fac. de Ciencias Veterinarias, UBA.

*dunleavy.mariana@inta.gov.ar

La inadecuada alimentación en el período perinatal y de crianza es una de las principales causas de mortandad de terneras, cuyos altos índices promedio a nivel nacional (10 a 12%) limitan la posibilidad de reposición y crecimiento genuino de los rodeos lecheros. Se estima que entre 22 y 62 L de leche por vaca se descartan al año, generando pérdidas económicas e impacto ambiental. La leche descartada suele incluir la de los primeros siete ordeños después del parto, como también la leche de vacas mastíticas y/o tratadas con antimicrobianos. Por otro lado, su uso para la alimentación de los terneros implica el aprovechamiento de un alimento de alta calidad nutricional y que no puede tener un destino comercial. Sin embargo, la alimentación de los terneros neonatos con leche de descarte sin pasteurizar, es también una vía de transmisión de infecciones por patógenos como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *Salmonella* spp, *Mycoplasma* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp y *Escherichia coli* entre otros agentes causantes de diarreas neonatales y neumonías. En la industria lechera, el ozono (O₃) ha sido aplicado tanto para el tratamiento de mastitis clínica, a partir del lavado de ubres con agua ozonizada, como para la desinfección de superficies de acero inoxidable. Se reportó una reducción de entre 0,5 y 1 logaritmo los conteos de bacterias mesófilas totales, levaduras y hongos presentes en la leche, sin alterar parámetros bioquímicos tales como la densidad o la acidez. No existen hasta la fecha estudios que evalúen los efectos de la ozonización sobre los anticuerpos calostrales. El presente estudio evalúa los efectos del O₃ en los conteos de bacterias mesófilas y sobre la concentración y funcionalidad de los anticuerpos presentes en el calostro bovino. Se desarrolló un dispositivo

a escala de laboratorio para el tratamiento de muestras de calostro bovino, obtenidas en condiciones de asepsia, que se sometieron a un burbujeo con ozono durante 30 minutos a 4°C. Se trabajó con cinco muestras, se efectuó el recuento de bacterias mesófilas y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes anti el virus de la diarrea vírica bovina (DVB-1), antes y después del tratamiento. Brevemente, se colocó 1 ml de una serie de diluciones seriadas 1/10 de cada muestra en placas y se cubrió con 15 ml de agar TSA a 40°C. Se incubó durante 24 h a 37°C y se contaron las colonias en las placas que contenían entre 20 y 200 colonias. Paralelamente, las muestras se centrifugaron a 28000 x g durante 2 h a fin de obtener suero lácteo para efectuar la prueba de seroneutralización. Mediante un test T para muestras apareadas, se observó una reducción significativa (p=0.0021) del número de bacterias mesófilas sin que se modifique significativamente el título de anticuerpos seroneutralizantes (p=0.3739). Además, se efectuó un seguimiento de sucesivos ordeños de un animal, procesados por duplicado, obteniéndose los siguientes títulos: 1240 (1°ordeño), 160 (3°ordeño) y <40 (5°ordeño), con valores de densidad de 1,069, 1,053 y 1,044, respectivamente. Estos valores no se modificaron cuando las muestras fueron tratadas con ozono durante 30 minutos. Estos resultados preliminares sustentan el uso de esta metodología que se propone como una alternativa económica para sanitizar el calostro y la leche de descarte en tambos de cualquier escala productiva. Futuros ensayos se orientarán a evaluar la efectividad de esta metodología sobre cada uno de los principales patógenos que afectan a los terneros.

43- Modulación diferencial de la inmunidad innata por cepas del virus de la diarrea viral bovina de diferente virulencia

Barone L^{2*}, Forlenza MB², Malacari DA¹, Capozzo AV^{1,2}; Cardoso N^{1,2}

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB)
CABA - República Argentina Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Virología-INTA Castelar, Nicolás Repetto y Los Reseros s/n Hurlingham (1686),
Pcia. De Buenos Aires, Argentina.

No existen conflictos de intereses.

* barone.lucas@inta.gob.ar

El virus de la diarrea bovina (VDVB) (Familia Flaviviridae, género pestivirus) es el agente etiológico causante de la enfermedad infecciosa en ganado bovino más extendida en el mundo. Posee dos genotipos principales, 1 y 2, y dos biotipos, citopático y no-citopático (ncp), según su efecto en cultivos celulares epiteliales. El VDVB produce cuadros entéricos, respiratorios e inmunosupresión severa que predispone al animal a sufrir infecciones secundarias por patógenos oportunistas. En nuestro laboratorio hemos caracterizado in vitro e in vivo en terneros privados de calostro, dos cepas ncp de genotipo 2; la cepa New York 93 (NY-93) de alta virulencia y la de baja virulencia 98-124 que corresponde a un aislamiento local. NY-93 produjo excreción viral y viremia por mayor tiempo en comparación con la cepa 98-124, además causó una leucopenia severa que se extendió hasta 17 días post-infección (dpi). En base a estos resultados planteamos las siguientes hipótesis: 1. Las cepas de diferente virulencia difieren en su capacidad de replicación en células inmunes bovinas, en su efecto sobre la viabilidad celular y en la expresión de citoquinas; 2. La cepa de baja virulencia posee menor capacidad de limitar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e interferones (IFNs), por lo que el sistema inmune podría controlar mejor su infectividad. Para comprobar estas hipótesis realizamos infecciones experimentales de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) bovinas o bien cultivos de monocitos (Mo) y macrófagos (Mφ) bovinos obtenidos a partir de células CD14+ con adherencia diferencial. Se estableció el tropismo viral sobre las CMSP y se estudió el efecto de la infección sobre la viabilidad celular en términos de apoptosis y necrosis. La cinética de replicación viral se estableció midiendo la producción de la proteína no estructural 3 viral (NS3) por ELISA y cuantificando el número de copias de genoma viral en los sobrenadantes de infección mediante RT-qPCR.

Para medir la activación del inflammasoma cuantificamos la secreción de IL-1β mediante un ELISA comercial. La expresión de citoquinas TNF-α, IL-10, IL-6, IL-12, IFN-α, γ, λ se determinó por RT-qPCR a las 24 horas post-infección (hpi). La cepa 98-124 causó una necrosis masiva de CMSP mientras que NY-93 indujo una apoptosis cercana al 40% a las 48 hpi que se mantuvo constante hasta los 7 dpi. 98-124 produjo más copias de genoma viral en sobrenadantes de CMSP con valores máximos medidos a las 24 hpi. Ambas cepas infectaron células T-CD4+, T-CD8+, células B, células dendríticas, Mo y Mφ; mostrando un tropismo preferencial por células presentadoras de antígeno. La cepa NY-93 infectó con mayor eficiencia Mo y Mφ, determinado tanto por NS3 como por copias de genoma viral. En cuanto a la expresión de citoquinas, NY-93 reguló negativamente casi todas las citoquinas ensayadas en CMSP a las 24 hpi, mientras que 98-124 indujo la expresión de IFN-λ e IL-12 y reguló negativamente o dejó sin cambios al resto de citoquinas. Solamente la cepa 98-124 activó el inflammasoma, determinado por altas concentraciones de IL-1β en CMSP a las 72 hpi e inmediatamente después de la adsorción viral en Mo. La necrosis masiva inducida por 98-124, con liberación de señales de daño celular, podría guardar relación con el perfil pro-inflamatorio y antiviral inducido por esta cepa, lo cual concuerda con la expresión de IL-12, IFN-λ y la activación del inflammasoma. La cepa NY-93 al infectar más eficientemente a Mφ, estaría controlando en mayor medida la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e IFNs por estas células claves en la inmunidad innata, contribuyendo a la evasión prolongada observada por esta cepa en infecciones in-vivo. La modulación de la respuesta innata por las cepas estudiadas puede explicar las diferencias en cuanto a su virulencia.

44- Caracterización de péptidos de proteínas implicadas en la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos que generan inmunidad neutralizante y memoria de larga duración

Mosqueda J.^{1*}; Hidalgo-Ruiz M.¹; Mejía-López S.¹; Suarez C.²; Pérez-Serrano RM³; Zaldívar-Lelo de Larrea G³.

¹Laboratorio de Inmunología y Vacunas, C. A. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños, Querétaro, Querétaro, México.

²Animal Disease Research Unit, USDA-ARS, Washington State University, 3003 ADBF, P.O. Box 646630, Pullman, WA 99164, USA; Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA 99164, USA.

³Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Querétaro. Fraccionamiento Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, Qro., México.

*joel.mosqueda@uaq.mx

El proceso de invasión al eritrocito por *Babesia bovis* es similar al de otros protozoarios Apicomplexa. Durante este proceso, los parásitos apicomplexos generan proteínas en sus organelos apicales que son blancos vacunales. Diversos estudios han caracterizado estas proteínas, sin embargo, muchas de ellas contienen epítomos B y T inmuno-dominantes que son variables entre cepas y son responsables de la incapacidad de vacunas basadas en esos antígenos de inducir una respuesta protectora heteróloga. Una forma de solventar este problema es la identificación de epítomos B y T conservados entre todas las cepas que generen respuestas Th1 que correlacionan con protección y que generen anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar péptidos conservados con epítomos B y T lineales de las proteínas AMA-1, MSA-2c, y RAP-1 que generen una respuesta inmune neutralizante y efectora de larga duración. Para ello, se utilizó una estrategia bioinformática inicial identificando péptidos conservados de estos antígenos entre diferentes cepas. En las regiones expuestas de las proteínas maduras, las regiones inmunogénicas y los epítomos B fueron predichos con los programas ABCpred, IEDB y BCEpred. Se identificaron péptidos en regiones conservadas, inmunogénicas y que contienen epítomos B predichos para cada proteína. Los péptidos se generaron por síntesis química en forma de dendrímeros de 8 ramas, fueron diluidos en PBS y emulsionados con adyuvante montanide ISA 71 VG (Seppic, Francia). Una cantidad total de 100 µg de cada péptido se inmunizó vía subcutánea en la región sub-escapular en bovinos nacidos y mantenidos en un área libre de garrapatas. Se tomó una muestra de suero pre-inmunización, y se realizaron cuatro inmunizaciones con intervalos de 21 días entre cada una, colectando la muestra de suero final, 15 días después de la cuarta inmunización. Las muestras de suero fueron evaluadas por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para identificar las

proteínas nativas en parásitos intraeritrocíticos fijados en portaobjetos. Para la evaluación de la respuesta celular de larga duración, se colectaron muestras de sangre periférica un año después de la primera inmunización. Se identificaron poblaciones de células T efectoras (CD4+/ CD45RO+) por citometría de flujo. Para la cuantificación de citocinas (INF-γ, IL-10 e IL-4) se colectaron sobrenadantes de cultivo a 18 horas post-estimulación. Finalmente, se evaluó in vitro la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados contra cada péptido, determinando los porcentajes de eritrocitos parasitados (PEP) por citometría de flujo. A partir de los PEP se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada péptido. La diferencia estadística (P<0.05) de los PEP entre los sueros pre y post inmunización fue determinada con una prueba T de Student de muestras independientes. Se obtuvieron 4 péptidos de AMA-1, 5 péptidos de MSA-2c, y 5 péptidos de RAP1 conservados en todas las cepas reportadas a la fecha. A excepción de los péptidos 4 de AMA-1 y 5 de RAP-1 (P4AMA1 y P5RAP1) que no fueron solubles en PBS pH 7.4, y de los péptidos P1AMA1, P1MSA-2c y P2RAP-1, que no generaron anticuerpos, todos los demás péptidos generaron anticuerpos que identificaron los merozoitos de *B. bovis* por IFI. Las células estimuladas con los péptidos P2AMA1 y P3RAP1 tuvieron porcentajes mayores de células T efectoras (p<0.05), sin embargo, en la producción de INF-γ esta diferencia no fue significativa. Finalmente, los porcentajes de inhibición generados por los péptidos fueron los siguientes: P2AMA1 6%, P3AMA1 4%, P3MSA2c 10%, P4MSA2c 10.4%, P1RAP1 32%, P3RAP1 5%, y P4RAP1 42%. Fue posible realizar la identificación de péptidos conservados que generan una respuesta inmune neutralizante y de larga duración. Esta respuesta es variable entre los péptidos de cada proteína y no todos los epítomos B y T de estas proteínas inducen respuestas humorales y celulares que correlacionan con protección en *B. bovis*.

45- Expresión de citoquinas en hembras bovinas lecheras preñadas infectadas naturalmente con *Neospora caninum*

Rambeaud, M.^{1,2*}, Moré, G.^{1,2}, Campero, L.M.^{1,2}, Dellarupe, A.^{1,2}, Venturini, M.C.¹

¹Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina
²CONICET.

*magdaram@fcv.unlp.edu.ar

La neosporosis bovina es una de las principales causas de aborto en rodeos de Argentina y del mundo. Si bien la enfermedad es causante de importantes pérdidas reproductivas, productivas y económicas, hasta el presente no existe tratamiento o inmunógeno capaz de prevenir la infección por *Neospora caninum*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de citoquinas en hembras bovinas preñadas infectadas naturalmente por *N. caninum*. Se conformaron 8 bloques de hembras bovinas preñadas (1 animal seropositivo y 1 animal seronegativo por bloque) agrupadas según su edad gestacional. Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción de vena yugular para aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de todos los animales en el 5° y 9° mes de gestación. Las CMSP fueron estimuladas in vitro con PBS (control negativo), Concanavalina A (ConA, 5 µg/ml; control positivo), y lisado de taquizoítos de *N. caninum* cepa NC-1 (5µg/ml) para análisis de la expresión de citoquinas por real time PCR (qPCR). De las CMSP estimuladas, se extrajo ARN total con un kit comercial. El ARN fue tratado con DNAsa durante la purificación, cuantificado mediante un fluorómetro y se evaluó su integridad por visualización de bandas 18S y 28S en gel de agarosa. El ARN (0,5 µg) se transcribió a cDNA mediante un kit comercial, y se determinó la presencia de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-2, IL-12 e interferón gamma (INFg) y de la ARN polimerasa II (Pol II) como gen de referencia, mediante la técnica de qPCR utilizando primers específicos reportados previamente y un master mix comercial. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real, bajo condiciones estándar. El análisis estadístico de los datos obtenidos

de animales en el 5° y 9° mes de gestación se realizó con el programa REST (<http://www.gene-quantification.de/rest.html>), el cual utiliza la randomización/permutación y *bootstrapping* de los datos, teniendo en cuenta la eficiencia de reacción del gen de interés y del gen de referencia. En el 5° mes de gestación se observó un aumento en la expresión de IL-2, IL-4 e INFg tanto en los animales seropositivos como seronegativos al estimular las células con ConA. No se observaron cambios en la expresión de citoquinas luego de la estimulación con lisado de taquizoítos en animales seronegativos; sin embargo, los animales seropositivos evidenciaron un aumento en la expresión de IL-4 e INFg. En el 9° mes de gestación el patrón de expresión de citoquinas en las células estimuladas con ConA fue similar al encontrado en el 5° mes de gestación. Al ser estimulados con lisado de taquizoítos de *N. caninum*, los animales seropositivos mostraron un aumento en la expresión de IL-4. Al comparar la respuesta inmune entre el 5° y 9° mes de gestación, se observó una disminución en la expresión de IL-10 e IL-12 en células estimuladas con ConA, y una disminución en la expresión de IL-4 e IL-2 en células estimuladas con lisado de taquizoítos, lo cual podría estar relacionado con el estado de inmunosupresión inherente al último estadio de la gestación. La determinación de la evolución del perfil de citoquinas en diferentes etapas de la preñez puede contribuir para aclarar la eficacia de las vías de transmisión y la importancia de la reactivación de la infección durante la preñez dado el complejo mecanismo inmune/endócrino que se produce en este período, lo que permitiría diseñar estrategias efectivas de control de la enfermedad.

46- Seroprevalencia a *Toxoplasma gondii* en cabras en zonas semirurales de la provincia de Salta, Argentina y su importancia como zoonosis

Mazzuca Analía^{1*}; Sarmiento Ricardo¹; Trova Gabriela¹; Ocaña Guillermo^{1,2}; Pintos Lucía¹; Rojas Cristina¹; Gauna Cyntia¹; Nolasco Abigail¹; Herazo Romina¹; Gutiérrez Daniela¹; Castillo Jimena¹; Sánchez Negrette Olga^{1,3}.

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta, Salta, Argentina.

² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

*amazzuca958@gmail.com

La toxoplasmosis es una zoonosis producida por el protozoo *Toxoplasma gondii*. Ocasiona problemas de tipo reproductivo en el caprino: abortos, fetos mortinatos y nacimiento de crías débiles. La enfermedad puede causar fetopatías si la primoinfección se produce durante el embarazo y lesiones oculares en individuos inmunocomprometidos. La diseminación de *T. gondii* puede deberse a la presencia de hospederos definitivos, supervivencia de ooquistes en el medioambiente, sistema de manejo y crianza del ganado. El objetivo es determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en cabras en zonas semirurales de la Provincia de Salta. Se muestrearon 208 cabras hembras, en edad reproductiva, criadas a libre pastoreo entre agosto 2016 y agosto 2017 de nueve Unidades Familiares Productoras (UFP) ubicadas en los departamentos de La Caldera, Los Andes, Cerrillos, Rosario de Lerma, La Viña y Capital. Los animales se estratificaron considerando el lugar de procedencia, categoría zootécnica (cabras vacías, preñadas y en lactancia) y antecedentes de abortos y/o nacimiento de crías débiles. El número de muestras se determinó mediante el programa WinEpi, con la prevalencia de 37% en cabras reportada por Rossanigo C. E., Venturini L et al. (2002). El tamaño de la muestra calculado fue de 189 cabras (se muestrearon 208). Para detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* se utilizó la prueba de Hemaglutinación Indirecta (HAI), kit Toxotest-Wiener. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat. En las nueve UFP se detectó el % de cabras seropositivas a *T. gondii*, en una muestra de 208 animales.

En el departamento de La Caldera fue de 83,3% (25/30) en Vaqueros, en La Calderilla se obtuvo 50% (6/12) y 60% (3/5) %, en dos UFP. En Los Andes, fue de 3,84% (1/26) considerando Cavy y Antofasilla (Tolar Grande). En La Isla del de Cerrillos, fue de 31,42% (11/35). En San Bernardo de las Zorras de Rosario de Lerma fue del 14,28% (2/14), en Coronel Moldes de La Viña fue del 16,45% (13/79) y en Capital fue del 28,57% (2/7). La seroprevalencia obtenida es comparable a la reportada por La Malfa J et al. (2013) del 35,9% en cabras en San Luis, Argentina y al 30,71% obtenida por Sella J et al. (1994) en cabras en Londrinas, Brasil y es mayor a la encontrada en zonas áridas de Salta y Jujuy, 13,09% (Suárez et al., 2016). Existe relación estadísticamente significativa entre la procedencia geográfica de las cabras y la seroprevalencia, siendo mayor en las regiones cálidas y húmedas (La Caldera) y más baja en climas secos y fríos, a mayor altitud sobre el nivel del mar (Los Andes). También se comprobó la asociación, entre cabras seropositivas y ocurrencia de abortos, estadísticamente significativa, y coincide con lo informado por Rossanigo et al, (1999). En cambio, no se evidenció asociación entre la distribución de títulos de anticuerpos antitoxoplásmicos de acuerdo a las categorías zootécnicas de las cabras. Conclusiones: La prevalencia de *Toxoplasma gondii* en cabras en zonas semirurales de la Provincia de Salta es de 30,28%. Existe asociación entre cabras seropositivas y ocurrencia de abortos.

47- Fracciones proteicas de leches de cabras y ovejas sospechosas de paratuberculosis

Ruggieri RL^{1*}, Fernández B², Calzetta Resio A¹, Mundo SL²

¹Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos;

²Inmunología; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* ruggieri@fvvet.uba.ar

La electroforesis es una técnica que permite identificar y caracterizar grupos de proteínas principalmente por su punto isoeléctrico, y se aplica en el estudio de la respuesta inmune dado que en las fracciones beta-gammaglobulinas se encuentran los anticuerpos. Estudios realizados en bovinos determinaron que ciertas patologías, como por ejemplo las mastitis, modifican los valores de las diferentes fracciones en leche, por lo tanto esta metodología puede ser utilizada para evaluar la calidad de leche. Nuestro objetivo fue identificar alteraciones en las fracciones proteicas en leches positivas al ELISA de paratuberculosis. Se tomaron muestras de leches de 16 cabras de raza Anglo-Nubian y 15 ovejas de raza Frisona de diferentes zonas de la provincia de Buenos Aires. Se determinó el porcentaje de proteínas totales en leche mediante el método físico-químico LACTOSKAN (BOECO). Además, cada muestra de leche se centrifugó 25 minutos a 10.000 rpm a 4°C, se retiró la porción grasa, obteniéndose el lactosuero en estudio. Este último se evaluó por electroforesis en tiras de celulosa (cellogel) durante 45 minutos a 182 voltios, se colorearon las bandas proteicas con 0,1% de azul de Coomassie y se evaluaron por densitometría (Dynex Technologies). Se clasificaron las muestras como positivas o negativas al ELISA de paratuberculosis (ELISA-PPA). Se determinaron los porcentajes (%) promedio y desvíos de las evaluaciones proteicas. Y se compararon los grupos positivos o negativos por T-student. De las 16 muestras caprinas analizadas, 8 fueron positivas al ELISA-PPA y 8 negativas. Los datos

(%) obtenidos para los grupos positivos y negativos fueron: proteínas totales: 4,45±0,31 vs. 4,48±0,41 (p=0,45); albúmina (A): 3,11±1,36 vs. 3,49±0,84 (p=0,26); alfa-lactoalbúmina (α-La): 37,60±9,91 vs. 39,70±15,09 (p=0,37); betagammaglobulinas (βγ-Lg): 59,28±10,99 vs. 56,80±15,43 (p=0,36). En las 15 muestras ovinas analizadas, 10 fueron positivas al ELISA-PPA y 5 negativas. Los resultados (%) obtenidos para los grupos positivos y negativos fueron: proteínas totales: 3,64±0,21 vs. 3,78±0,20 (p=0,12); A: 5,59±3,31 vs. 5,31±1,57 (p=0,43); α-La: 64,01±10,57 vs. 61,36±18,32 (p=0,36); βγ-Lg: 30,40±11,11 vs. 33,33±17,88 (p=0,35). El número de muestras analizadas no permitió identificar diferencias significativas entre animales positivos y negativos al ELISA-PPA. Considerando los valores de los negativos como parámetro de animales clínicamente sanos, se detectaron diferencias en la composición porcentual de las proteínas lácteas entre las especies: en las leches de cabras predominó la fracción βγ-Lg mientras que en oveja las α-La. Sin embargo, Alais describe a la fracción βγ-Lg como la principal en la leche ovina (1970). Nuestros resultados obtenidos hasta el momento indican que la paratuberculosis no modifica las fracciones proteicas en las leches de cabras y ovejas. Hemos identificado la poca información disponible sobre la composición proteica láctea en pequeños rumiantes, consideramos estos datos fundamentales para su utilización en control de calidad láctea por lo que continuaremos con su determinación.

48- Caracterización de la respuesta innata inducida por una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* Mb04-303

Blanco FC*, Gravisaco MJ, Garcia E, Klepp LI, Forrellad M, Vazquez C, Villafañe L, Rocha V, Bigi F

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CICVyA, Instituto de Biotecnología), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

*blanco.federico@inta.gob.ar

La tuberculosis bovina es una enfermedad enzootica que causa grandes pérdidas económicas en nuestro país. El agente etiológico es *Mycobacterium bovis* y su transmisión al hombre puede estar dada por contacto directo con animales infectados o a través del consumo de lácteos y derivados. El diagnóstico de la enfermedad así como el desarrollo e implementación de una vacuna efectiva dependen del estudio en profundidad de la interacción patógeno-hospedador. En el presente trabajo caracterizamos la respuesta inmune innata del bovino frente a tres aislamientos de *M. bovis* de alta (Mb04-303), media (MbUK) y baja virulencia (Mb534). Empleamos dos modelos de estudio *in vitro*: co-cultivos de macrófagos primarios bovinos y linfocitos autólogos y células mononucleares de sangre periférica. Mediante estudios transcriptómicos (qPCR) de los co-cultivos infectados pudimos determinar que Mb04-303 presentó una respuesta innata proinflamatoria con elevados niveles de IFN γ , iNOS e IL-22 a diferencia de MbUK (NCTC10772) y Mb534. La expresión de IFN γ también estuvo aumentada en las infecciones con MbUK, pero dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. Mientras que Mb534 dio

niveles similares a los co-cultivos sin infectar. Además, se estudió la activación celular (expresión de CD25) empleando citometría de flujo. Las poblaciones NKp46+, WC1+ y CD4+ presentaron un aumento de células CD25+ solo en los co-cultivos infectados con Mb04-303. Luego, se caracterizaron las poblaciones celulares responsables de la mayor expresión de IFN γ en los co-cultivos infectados con MbUK y Mb04-303. A partir de estas determinaciones pudimos validar los resultados obtenidos por qPCR e identificar a la población de células NKp46+ IFN γ + como la mayoritaria. Con la finalidad de estudiar los factores de virulencia responsables de esta respuesta innata inducida por Mb04-303 evaluamos al patógeno inactivado, sus lípidos purificados y los compuestos secretados. Mediante nuestros resultados pudimos concluir que la viabilidad del patógeno, la presencia de células presentadoras de antígeno (CPA) maduras y los compuestos secretados por Mb04-303 son determinantes en la primera interacción patógeno-hospedador.

49- MVA recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico inducen una respuesta inmune humoral específica y duradera en ratones

Garanzini D^{1*}, Del Médico Zajac MP^{2,3}, Pérez O¹, Calamante G²

¹ Servicio de Vacuna Antirrábica, INPB-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Biotecnología, INTA. Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

³ CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

garanzini.debora@inta.gob.ar

La estrategia de control de la rabia en nuestro país se realiza con vacunas basadas en virus rábico inactivado (producidas por amplificación viral en sustratos celulares), que si bien son efectivas, presentan ciertas desventajas por la composición indefinida del antígeno, manipulación de grandes cantidades del patógeno en las plantas de producción, necesidad de estricta cadena de frío y la dificultad para diferenciar animales infectados de vacunados. Existen numerosos ejemplos de desarrollos biotecnológicos que demuestran que es posible articular la inversión estatal con la industrial para generar servicios y productos biotecnológicos de impacto productivo y/o social. De esta forma se podrían superar los inconvenientes de las vacunas tradicionales mencionados desarrollando vacunas basadas en microorganismos vivos no replicativos, diseñadas racionalmente para que, induciendo diferentes ramas del sistema inmune, sean seguras y efectivas para la prevención de enfermedades infecciosas. En particular, el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) ofrece numerosas ventajas para el desarrollo de vacunas: estabilidad (física y genética), administración por diferentes vías, inducción de respuestas inmunes humorales y celulares protectoras e inmunidad duradera, ausencia de replicación en la mayoría de las células de mamíferos. El antígeno de interés para el desarrollo de vacunas antirrábicas biotecnológicas (vectorizadas por virus o a subunidades proteicas) es la glicoproteína del virus rábico (RG). Esta proteína es la única expuesta en la superficie del virión y es capaz de inducir respuesta inmune humoral (posee un gran número de sitios antigénicos blanco de anticuerpos neutralizantes). Los objetivos de este trabajo son la obtención de MVA recombinantes que expresen la proteína RG y la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida en ratones. Los MVA recombinantes se obtienen por recombinación homóloga entre el genoma del virus y un vector de

transferencia que porta el gen de interés flanqueado por regiones genómicas que serán el blanco de inserción. Para obtener el virus MVA-RG la secuencia codificante de la proteína RG se clonó en el vector de transferencia VT-Mtk-GUS (obtenido previamente en nuestro laboratorio) y se transfectaron fibroblastos de embrión de pollo previamente infectados con MVA. Los virus recombinantes se aislaron por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia del sustrato de la enzima GUS. La presencia y expresión del gen de interés se confirmó mediante PCR y Western blot, respectivamente. Posteriormente, ratones Balb/C se inmunizaron intraperitonealmente con dos dosis de 10E+06 unidades formadoras de placas de MVA (recombinante o no recombinante) a los días 0 y 21. A distintos tiempos post inmunización se realizaron sangrías exploratorias y se evaluó la presencia de anticuerpos específicos anti virus rábico mediante ELISA. Se obtuvieron los virus MVA-RG y se confirmó la expresión del antígeno de interés mediante la técnica de Western blot. La presencia del gen de interés y la pureza del stock viral recombinante se confirmaron por amplificación por PCR. En las muestras de suero provenientes de los ratones inmunizados con MVA no recombinante no se detectaron anticuerpos anti virus rábico. En cambio, la inmunización de ratones con MVA-RG indujo una respuesta inmune específica que fue potenciada por la aplicación de la dosis de refuerzo (diferencias significativas $p < 0,01$). Esta respuesta inmune se mantuvo hasta los 3 meses post segunda inmunización, observándose diferencias significativas con el grupo control ($p < 0,001$). En este trabajo se obtuvieron MVA recombinantes que expresan la proteína RG del virus rábico y se demostró su capacidad de inducir respuestas inmunes humorales específicas y duraderas luego de dos inmunizaciones. En el futuro, se evaluará la capacidad de MVA-RG de proteger contra el desafío con virus rábico en el modelo murino.

50- Validación de nuevos biomarcadores de tuberculosis bovina en ganado naturalmente infectado

Klepp, L.^{1*}, Blanco, F.¹, Eirín, M.¹, Garbaccio, S.², Bigi, F.¹

¹ Instituto de Biotecnología, INTA, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Patobiología, INTA, Buenos Aires, Argentina.

* klepp.laura@inta.gob.ar

La tuberculosis (TBC) bovina es una enfermedad que limita la producción animal y justifica barreras de comercialización entre países. Además, constituye un problema para la salud humana. Una de las estrategias para el control y erradicación de la TBC es a través del diagnóstico y eliminación de los animales enfermos, para lo que es necesario poseer métodos de diagnóstico eficaces. El test de tuberculina (TST, tuberculin skin test) y el test de liberación de IFN γ (IGRA, IFN γ release assay) son los dos métodos de diagnóstico más comúnmente usados para detectar TBC bovina. Sin embargo, se necesitan otras técnicas complementarias para un diagnóstico más certero y confiable. Es por eso que en este trabajo nos propusimos validar a campo nuevos biomarcadores de TBC en el ganado bovino. Los biomarcadores elegidos fueron identificados previamente por nuestro grupo de trabajo (IL-17, THBS1, FYVE, IL1R, CD14 y MMP9; Blanco et al. 2011 y 2012) y por el grupo de Aranday-Cortes (CXCL9, CXCL10 e IL-22; Aranday-Cortes et al. 2012). En este trabajo se tomaron muestras de sangre de 32 bovinos. De éstos, 16 provenían de tambos de nuestro país con alta prevalencia de TBC y presentaron lesiones tuberculosas al momento de la necropsia por lo que se consideraron TBC positivos, mientras que los restantes 16 (TBC negativos) provenían de rodeos libres. A todos los animales TBC positivos se les realizó el TST y el IGRA test. De los 16 animales TBC positivos, 12 fueron negativos para el TST y 8 negativos para el IGRA test. A partir de las muestras de sangre

se prepararon células mononucleares de sangre periférica, las cuales se pusieron o no a estimular con PPD_b, luego se extrajo el mRNA y se cuantificó el nivel de expresión de cada biomarcador por qRT-PCR. Encontramos que CXCL9, THBS1, MMP9 e IL-22 presentaron diferencias significativas en los valores de *fold change* entre animales infectados y sanos. Además, si bien IL-17 y CXCL10 no mostraron diferencias significativas, sus valores de *fold change* fueron mucho más altos en los animales enfermos que en los sanos. Por otro lado, también observamos que los biomarcadores MMP9, THBS1, CXCL10 e IL-22 mostraron diferencias significativas entre los grupos TBC+/TST- y TBC-, y por lo tanto se podrían emplear para diferenciar animales sanos de enfermos en el grupo de falsos negativos al TST. Asimismo, los biomarcadores CXCL10 e IL-22 presentaron diferencias significativas entre los grupos TBC+/IGRA- y TBC-. Debido a que todos los animales TBC+/IGRA- muestreados resultaron ser también TST negativos, podemos concluir que CXCL10 e IL-22 son dos biomarcadores que posiblemente permitan distinguir bovinos sanos de enfermos cuando los dos tests diagnósticos más usados arrojan resultados falso negativos. Estudios futuros con un mayor número de animales serían necesarios para llegar a una conclusión certera. De este modo, en este trabajo se encontraron biomarcadores que constituyen potenciales herramientas para complementar las actuales pruebas diagnósticas de TBC bovina.

51- Estudio sobre calidad física y bacteriológica de calostro bovino

Aguirre, F.*; Angeli, E.; Ruiz, M.; Russi, N.; Cabaña, E.; Almada, J.; Cabrera, A.; Allasia M.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

*faguirre@fcv.unl.edu.ar

El ternero recién nacido depende de la inmunidad pasiva recibida a través del consumo de calostro para hacer frente a los agentes infecciosos presentes en las crianzas. El objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad de calostro suministrado y su relación con la transferencia de inmunidad y condición sanitaria de los terneros en una unidad de crianza artificial de la provincia de Santa Fe. Para ello se trabajó realizando calostrados forzados a terneros neonatos (53 animales). Se utilizó tanto el suministro de calostro fresco, como también calostro almacenado en forma de refrigerado y congelado. Se registró en todos los casos el tiempo transcurrido entre el nacimiento y el suministro. La calidad del calostro fue estimada por medio de la medición de la densidad mediante calostrímetro. Para evaluar la calidad bacteriológica y el grado de contaminación del mismo se tomaron muestras en dos momentos: por un lado al realizar la recolección del calostro mediante el ordeño manual y por el otro, al momento del suministro al ternero, obteniendo la muestra directamente desde la mamadera. Las muestras en recipiente estéril se remitieron al Laboratorio de Bacteriología en donde se realizó el recuento de mesófilos totales y de coliformes. La estimación de la eficiencia de transferencia de inmunidad a los terneros fue realizada mediante el estudio de proteínas séricas totales al tercer día de vida por refractometría óptica. Los resultados mostraron que solamente el 65% de las vacas produjeron calostro de "buena calidad". Sólo el 40 % de los calostros de "mala calidad" tenían características de color y aspecto compatibles con dicha condición (color blanquecino y baja viscosidad). Con respecto a la calidad microbiológica, el 96% de las muestras que fueron obtenidas al momento de la recolección del calostro de las vacas fueron clasificadas como "aptas bacteriológicamente". De las muestras recolectadas al momento del suministro a los terneros, el 43% de las mismas registraron altos recuento de mesófilos

y/o coliformes. Existieron diferencias notables de acuerdo a si se utilizaba calostro almacenado o calostro "fresco". Todas las muestras obtenidas de calostro "fresco" fueron "aptas". En cambio el 65% de las muestras recolectadas de calostro almacenado (refrigerado o congelado) tuvieron recuentos por encima de los niveles de aptitud. No se constató que los animales que consumieron calostro "apto bacteriológicamente" tuvieran mejor transferencia de inmunidad que los que consumieron calostro "no apto" ($\chi^2=0,48$; $p=0,49$). Se encontró relación estadísticamente significativa entre la "eficiente transferencia de inmunidad" y los terneros que recibieron el suministro de calostro antes de las 2 horas de vida ($\chi^2=5,27$; $p=0,02$). Del mismo modo se observó relación entre los terneros que consumieron calostro de "buena calidad" con la correcta transferencia de inmunidad ($\chi^2=4,37$; $p=0,03$). No ocurrieron muertes de terneros en la crianza. El 88% de los mismos registró al menos un cuadro de diarrea. Solamente 3 animales desarrolló diarrea antes de los 7 días de vida. No existió relación entre la presencia de diarrea y el consumo de calostro "no apto bacteriológicamente". Los resultados del presente trabajo muestran que una gran proporción de vacas no producen calostro de calidad que asegure la transferencia de inmunidad a sus crías. Este hecho reafirma la utilización de la herramienta de almacenar calostro refrigerado o congelado. El presente trabajo muestra también que gran parte de los calostros que se suministraron no contaban con condiciones bacteriológicas aptas. Esto genera la inquietud de trabajar en mejorar las condiciones de recolección, almacenaje y suministro a los terneros ya que muchos autores concluyen en la importancia de la aptitud bacteriológica del calostro bovino para mantener una buena transferencia de inmunidad. Se necesitan realizar más estudios, involucrando a mayor número de animales a fin de contar con datos más certeros.

52- El uso de un liposoma con MAN α 1-2MAN-PEG-PE potencia la inmunogenicidad inducida por una nanovacuna genica liposomal contra Herpes Virus Bovino tipo 1

Kornuta Claudia^{1,2}; Pappalardo JS⁴; Bidart, J^{1,2}; Salmaso S⁵; Torchilin, V⁶; Quattrocchi, V¹; Zamorano, P^{1,2,3}; Langellotti, C^{1,2}

¹Instituto de Virología-CICVyA, INTA;

²CONICET;

³USAL;

⁴INTA EEA Bariloche;

⁵Universita degli Studi di Padova;

⁶Northeastern University.

En la búsqueda de mejorar la protección inducida por una vacuna génica frente al Herpesvirus Bovino tipo 1 (HVBo-1), se pretende potenciar la mencionada vacuna mediante el uso de nanovehículos que transporten estos plásmidos hacia las células dendríticas (CD) permitiendo así estimular a los linfocitos T vírgenes. Se cuenta con una molécula sintética de un derivado de 2 α -manobiosa (Man α 1-2Man-PEG-PE), que por medio de su anclaje a liposomas permite direccionar de manera específica antígenos y ácidos nucleicos hacia receptores de membrana DC-SIGN presentes en CD. En este trabajo se utilizaron ratones BALB/c; los cuales se inmunizaron con una vacuna a ADN que codifica para la versión secretada de la glicoproteína D de HVBo-1 utilizando como vector pCIneo (pCIgD). Se formuló un liposoma que contiene la molécula Man α 1-2Man-PEG-PE junto a LPS (Rough Mutant) y también se evaluó la acción de la melitina gD (gD), glicoproteína D del HVBo-1 recombinante fusionada a melitina, obtenida de extracto de larvas de insecto. Cinco grupos de ratones (n=5) fueron inoculados por vía intradérmica los días 0 y 20 con: (I) pCIgD (en ambas fechas); (II) pCIgD (1^o inmunización) y gD (booster); (III) pCIgD-liposoma (en ambas fechas); (IV) pCIgD-liposoma (1^o inmunización) y gD-liposoma (booster); (V) pCIneo-liposoma (en ambas fechas, como control negativo). En las formulaciones se usó: 15ug de vacuna génica y 10ug de gD. Los sueros de los ratones fueron evaluados con un ELISA directo contra HVBo-1 desarrollado en nuestro laboratorio, y los resultados obtenidos,

analizados estadísticamente por ANOVA y Dunnet como test posterior. Tanto a los 20 dpv como a los 40 dpv, los grupos que contenían en su formulación liposomas, presentaron diferencias significativas en el nivel de anticuerpos totales con respecto a los grupos que no incluyeron liposoma en la vacuna. A los 40 dpv el nivel de anticuerpos anti HVBo-1 inducido por la vacuna génica con liposoma (grupo III) fue de 3.54 \pm 0.60 y en el grupo re-inmunizado con proteína y liposoma (grupo IV) fue de 3.66 \pm 0.37, mientras que en los otros grupos que no contenían liposomas fue de 2.06 \pm 0.65 y 2.54 \pm 0.54, para el grupo II y grupo I respectivamente. Posteriormente se evaluaron los anticuerpos totales a los 120 dpv observándose un incremento en los títulos de anticuerpos de los grupos III y IV con respecto a los 40 dpv. Al evaluar en los sueros los isotipos inducidos a 40 dpv, se detectaron niveles significativos ($p < 0,001$) de anticuerpo IgG1 en los animales que recibieron las vacunas con liposoma respecto a los demás grupos. También hubo aumento de los isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 pero no fue significativa la diferencia entre ellas. Estos resultados son alentadores en la búsqueda de potenciar la vacuna a ADN, ya que se observa buena respuesta humoral específica y duradera en el tiempo. Este trabajo debe complementarse con una evaluación a nivel celular para estudiar lo que sucede con la respuesta citotóxica y de esta manera conseguir una visión global del efecto que tiene la nanovacuna génica liposomal con Man α 1-2Man-PEG-PE.

SESIÓN 4: DOCENCIA

53-Análisis de la pertinencia de los cursos de Inmunología animal básica e Inmunobiología animal aplicada en el trayecto del plan de estudios de la carrera de Medicina Veterinaria, UNLP

Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias,
UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

* mortola@fcv.unlp.edu.ar

En la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, en el año 2006 se inició el nuevo plan de estudios de la carrera, con modificaciones sustanciales que incluyeron nuevos cursos, reubicación dentro del plan de estudios, modificación de la carga horaria, correlatividades, etc. Como resultado, la asignatura original de Inmunología Veterinaria de estructura anual y ubicada en 5to año de la carrera, se dividió en 2 cursos semestrales: Inmunobiología Animal Básica (IAB) e Inmunobiología Animal Aplicada (IAA) de 70 h cada uno. IAB se ubicó en el primer semestre de 2do año de la carrera, brindando a los alumnos los contenidos básicos de inmunología; el curso de IAA se ubicó en el segundo semestre de quinto año de la carrera, abarcando la inmunoprofilaxis y el inmunodiagnóstico. El número promedio de alumnos es de 440 alumnos en IAB y 140 alumnos en IAA. Con el objetivo de recabar información sobre la pertinencia de los cursos de IAB e IAA en el trayecto del plan de estudios de la carrera, se realizó a los alumnos de IAA una encuesta obligatoria y de modalidad online. La encuesta se llevó a cabo mediante la aplicación *Google Form*, a través de un link insertado en la plataforma Moodle del curso de IAA. Los alumnos la completaron el día de inicio del curso, a la cual accedieron a través de sus teléfonos celulares. Se analizaron los datos de 140 respuestas. De los alumnos que cursaron IAA el presente año (2017) solo el 4,5% cumplieron con el trayecto pautado en el plan de estudios (Ingreso en el año 2013), el 26,1% ingresó en el año 2012, el 17,2% en el año 2011 y 14,2% en el año 2010, estos datos centralizan el 65% del total, los restantes corresponden a un desgranamiento que lleva hasta el año 1998. En cuanto al lapso de tiempo transcurrido entre el curso de IAB e IAA, solo el 11,2% de los alumnos lo hizo en el trayecto de 3 años pautado por el plan de estudios. El 41% lo realizó el trayecto en 4 años y el 18,7% en 5 años, los porcentajes restantes corresponden

a lapsos de tiempo mayores de hasta 8 años. De los 140 alumnos que llegaron a 5to año, el 60% aprobó el curso de IAB por promoción y el 40% restante lo hizo mediante un examen final integrador. De la pregunta 4 a la 20 de la encuesta se evaluaron conceptos de contenidos mínimos de IAB necesarios para el curso de IAA. El porcentaje promedio de respuestas correctas fue 74,6%. Del análisis de los datos se desprende que existe un marcado desgranamiento de la matrícula de alumnos, solo el 31% de los alumnos de 2do año llega a 5to de la carrera. El abandono de los estudios universitarios en el nivel de pregrado, es un fenómeno global en el sistema universitario argentino, que conlleva la necesidad de desarrollar políticas de retención. En cuanto al tiempo en que alumno transita dentro de la universidad, el lapso promedio entre que ingresa y llega a 5to año es de 11 años. En la asignatura inmunología veterinaria es interesante destacar que el tiempo promedio entre la cursada de IAB e IAA es de 5,5 años, cuando el óptimo sería 3 años. Este incremento en el lapso de tiempo podría ser la resultante de varios factores del sistema educativo universitario general y que muchos autores los concentran en 3 grandes hipótesis: 1-la "necesidad de trabajar" de los alumnos y la dificultad para compatibilizar los horarios laborales y las exigencias de estudio, 2- el "capital cultural" de los alumnos, que ingresan a un mundo universitario que les es ajeno, y 3- la "calidad académica", que está asociado a la relación pedagógica y a cómo se establece el vínculo estudiante-profesor en el aula. De nuestro análisis, podemos rescatar que la promoción de alumnos en el curso de IAB es satisfactoria, asimismo como la internalización de conceptos de contenidos mínimos de la asignatura. Podemos concluir que además de la amplia gama de concepciones sobre estos temas, es necesario precisar las funciones de los principales actores en este escenario de la educación: el profesor y el alumno.

54- Relación entre la composición de las cohortes de Inmunobiología Animal Básica (IAB) con los porcentajes de promoción del curso

Campero L.M.^{1,2}, Venturini M.C.¹, Gos M.L.^{1,2}, Rambeaud M.^{1,2}, Samus S.¹, Dellarupe A.^{1,2}, Bernstein M.^{1,2}, Pardini L.^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

² CONICET

El curso de Inmunobiología Animal Básica (IAB) se encuentra ubicado en el primer cuatrimestre del segundo año de la carrera de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Tiene dos bandas horarias, con 5 horas presenciales por semana /alumno. El objetivo planteado fue analizar la composición de las cohortes de IAB desde 2011 a 2016 y relacionarla con los porcentajes de aprobación y promoción que tuvieron los estudiantes del curso. Los datos de composición de las cohortes se obtuvieron a partir del programa Pentaho. Se comparó el porcentaje de aprobación/promoción de IAB desde 2011 hasta 2016 en relación con la composición de las cohortes según el año de ingreso a la carrera de Ciencias Veterinarias, considerando por una parte al grupo de estudiantes de las últimas 2 cohortes de cada año analizado, comparado con el total de estudiantes provenientes de cohortes previas. La hipótesis de trabajo fue que al haber transcurrido poco tiempo desde que cursaron asignaturas relacionadas, los contenidos aprendidos son una herramienta facilitadora en el proceso de aprendizaje y aprobación por promoción de IAB. El porcentaje de alumnos que promocionó IAB fue variando en las sucesivas cohortes: 42% en 2011 y 2012 (91/215 y 103/243, respectivamente), 45% en 2013 (162/359),

51% en 2014 (183/356), 59% en 2015 (222/379) y 50% en 2016 (198/399). Los resultados demostraron asociación significativa entre las variables promoción y composición de cohorte, detectándose mayor porcentaje de estudiantes que promocionaron IAB cuando provenían de las últimas 2 cohortes de ingreso para los años 2013 ($p=0,0015$), 2014 ($p=0,0122$), 2015 ($p<0,0001$) y 2016 ($p=0,002$). Para las cohortes de los años 2011 y 2012 no se detectó asociación significativa entre las variables analizadas ($p=0,4109$ y $p=0,1618$, respectivamente). Cabe destacar que en las cohortes de ingreso 2013 y 2014 la FCV implementó el curso Área Básica del Conocimiento (ABC) como herramienta educativa de nivelación. En el año 2015 se incorporó a IAB una tecnología de la información y la comunicación (TIC) como una herramienta en la metodología de enseñanza, que consistió en las presentaciones Power Point con audio como un nuevo recurso educativo, coincidiendo ese año con mayor porcentaje de promoción (59%). Sumado a ello, de acuerdo a estos resultados podemos considerar que la pertenencia a cohortes de ingreso más cercanas al año de cursada de IAB, pudo tener efecto en el desempeño de los estudiantes para aprobar por promoción en el período 2013-2016.

55- La enseñanza de la inmunología veterinaria en la Universidad Nacional de Villa María

Porporatto, C.* , Conesa, A., Breser, M.L.

Carrera de Medicina Veterinaria, Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María. Arturo Jauretche 1555, Villa María, C.P.:5900, Córdoba Argentina

*cporporatto@unvm.edu.ar

La asignatura Inmunología de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Villa María se dicta en el segundo cuatrimestre de segundo año. En el mismo cuatrimestre se dictan las asignaturas Fisiología II, Patología General y Sociología Rural y Urbana. En este curso se pretende que los estudiantes comprendan los mecanismos moleculares y celulares de los elementos que integran al Sistema Inmune, que determinan su óptimo funcionamiento, trasladando este conocimiento a la prevención de enfermedades infecciosas e inmunológicas de los animales, su diagnóstico, tratamiento y control. El dictado consta de 64 horas en el cuatrimestre, distribuidas en un 70% de clases teóricas y un 30% de clases prácticas. Estas últimas se organizaron en dos trabajos prácticos de laboratorio y tres seminarios. La evaluación del curso se realiza por escrito, con una evaluación continua al finalizar cada trabajo práctico y 2 exámenes parciales, en los cuales se evalúan tanto los contenidos teóricos como prácticos. La evaluación comprende preguntas de opción múltiple, verdadero/falso con justificación, a completar o relacionar y de desarrollo breve. El examen final de los alumnos regulares es escrito, con preguntas de la misma modalidad. En el examen final, los estudiantes libres realizan un examen oral y escrito, debiendo aprobar el 70% de los contenidos prácticos para poder ser considerado la evaluación escrita de los contenidos teóricos. Se cuenta con

la plataforma de aprendizaje Moodle, la cual proporciona un espacio de organización de las actividades semanales y de acceso de las clases dictadas y del material bibliográfico sugerido. Se ha observado durante el dictado del curso y la evaluación del mismo, dificultades en la comprensión e interpretación de las distintas pruebas diagnósticas y su relación con los temas dictados en las clases teóricas. Para ayudar al desempeño de los estudiantes en las evaluaciones y la integración de temas de la asignatura, se mejoró la relación docente/estudiante y se modificó el dictado de las actividades prácticas mediante la implementación de cuatro prácticas de laboratorio y un seminario de exposición de trabajo por parte de los estudiantes. Además se implementó el dictado de teóricos-prácticos previos a cada actividad práctica. Estas estrategias han permitido una mejor comprensión por parte de los estudiantes de los fundamentos de las distintas metodologías utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas e inmunológicas y su relación con las bases funcionales del sistema inmune, así como mayor entusiasmo en el cursado de la asignatura. Dado que las dificultades persisten en algunos estudiantes, se plantea trabajar con la enseñanza basada en la resolución de problemas vía entorno virtual mediante la plataforma educativa. La aplicación de nuevas estrategias que estimulen el interés y la participación de los estudiantes en clase, permitirá una mejor comprensión de la disciplina.

56- Aprendizaje colaborativo e invertido (flipped learning) aplicados en la enseñanza de inmunología veterinaria

Mazzuca Analía^{1*}; Gorchs Carolina¹; Cardozo Silvia¹; Barrios Pamela¹; Sarmiento Ricardo¹; Gauna Cyntia¹; Nolasco Abigail¹; Rojas Cristina¹; Garay Analía¹; Castillo Jimena¹; Arjona Lurdes¹; Sanz Céspedes Mario¹; Vitulli Gabriel¹; Sánchez Negrette Olga^{1,2}.

¹Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta, Salta, Argentina.

²Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

*amazzuca958@gmail.com

Se investigó la aplicación de métodos de enseñanza basados en el estudiante, como son el aprendizaje colaborativo y la técnica de *flipped learning* (aprendizaje invertido). El objetivo de este trabajo fue describir su implementación y analizar la eficacia de estos procesos de enseñanza aplicados a la materia Inmunología, de 3º año de la carrera de Veterinaria de la Universidad Católica de Salta. En el aprendizaje colaborativo se consigue una interdependencia entre los estudiantes, quienes interactúan y se complementan entre sí, conformando pequeños equipos para realizar las prácticas en el laboratorio. El Aprendizaje Invertido es un enfoque pedagógico que se realiza en horas no presenciales por lo que el tiempo en clase se utiliza para ampliar actividades de aprendizaje explicativo. Los estudiantes, desde sus hogares, aprenden los conceptos núcleo de las técnicas de diagnóstico inmunológico a través de recursos digitales interactivos, para luego poner en práctica estos conocimientos en el laboratorio con la orientación del equipo de profesores e instructores, de quienes reciben retroalimentación. (Relación docente – estudiante: 1:4). En el *flipped learning*, el proceso se invierte porque los estudiantes no comprenden conceptos explicados en horas presenciales para luego reforzarlos en solitario sino al revés. El equipo de profesores de las cátedras de Inmunología y de Enfermedades Infecciosas de la carrera de Veterinaria seleccionó material multimedial que, después fueron practicados en los laboratorios. Los estudiantes ejercitaron el saber procedimental (aprender

a hacer); el saber conceptual (aprender a conocer); y el saber actitudinal (aprender a convivir). Se centró en una investigación exploratoria que recurre a métodos cualitativos basados en la observación. Fue necesario realizar una investigación evaluativa con la visión relativista (Scriven, 1994), fundamentada en: Los antecedentes, los procesos y los efectos. En los antecedentes, se analizó las condiciones necesarias para la aplicación del Taller de Técnicas de Laboratorio de Diagnóstico Inmunológico para conseguir un aprendizaje activo mediante las metodologías del trabajo cooperativo y el de aula invertida. En la fase de procesos se coordinó y describió cuáles y cómo fueron las actividades realizadas en los laboratorios: las técnicas de ELISA, Inmunodifusión en Agar, Inmunofluorescencia y Aglutinación. Se contrastó los resultados de la aplicación de estas prácticas con los obtenidos en años anteriores. Se mejoró el resultado en competencias: conocimientos, habilidades y actitudes. Los estudiantes evaluaron su entendimiento y extendieron su aprendizaje; se implicaron con una actitud más interactiva; y la responsabilidad que adquirieron cuando se aplicó el método de aprendizaje colaborativo en grupos provocó que la incorporación de conocimientos de Inmunología sea mayor. En aquellos casos en los que la intervención resultaba ser menor por parte de un integrante, el propio equipo le recordaba que ellos dependen de él. Así ocurrió con la planificación y realización de los Informes de Laboratorio.

57- Lectura crítica de material publicitario comercial como herramienta didáctica para la integración y resignificación de los conceptos teóricos en materias del ciclo superior de la carrera de médico/a veterinario/a

Peralta, L.^{1*}; Schaer, J.M.¹; Correa, D.A.¹; Calle, D.S.¹; Garre, M.A.¹; Besso, R.¹

¹ Cátedra de Sueros y Vacunas - Facultad de Ciencias Veterinarias-U.N.R. Casilda, Santa Fe, Argentina.

* leperalta@gmail.com

En el ciclo superior de la carrera de medicina veterinaria las asignaturas combinan la integración de contenidos previamente abordados en las materias básicas, con nuevos conceptos y metodologías inherentes al desarrollo de la práctica profesional. Si bien los estudiantes invierten gran cantidad de tiempo en la lectura, intentado fijar conocimientos y comprender la información recibida, muchas veces no se muestran capaces de asumir una postura respecto a los contenidos. Leer es entonces una tarea cotidiana enfocada a comprender y aprender pero no a desarrollar un pensamiento crítico. Esta apreciación observada por los docentes a cargo de la materia Sueros y Vacunas de la Facultad de Cs Veterinarias de la UNR se ve reafirmada por la consulta constante de los alumnos/as sobre las aplicaciones prácticas de los contenidos trabajados en clases. Asimismo, se ha evidenciado en los estudiantes avanzados la incapacidad de resolver situaciones problemáticas aplicando las herramientas teóricas aportadas en el curso. Se planteó realizar el presente trabajo cuyo objetivo fue confrontar a los alumnos con material publicitario comercial disponible para los médicos/as veterinarios/as, estimulando su lectura crítica a partir de tres consignas: justificar el acuerdo o no con los conceptos vertidos en él, reconocer la presencia o no de errores conceptuales en los textos y proponer mejoras en cuanto a la calidad de la información brindada al lector. Se dividió a los alumnos en 10 grupos de debate de 5 integrantes. Se entregó material publicitario comercial en tres formatos: presentación de una línea de biológicos, divulgación de una vacuna y plan sanitario propuesto por un laboratorio en base a su línea de producción. Todo el

material hacía referencia a la inmunoprofilaxis en bovinos, temática que se había desarrollado completamente en clases teóricas y en un seminario integrador, habiéndose culminado la instancia de evaluación parcial. Junto con el material se entregó una guía con las consignas a resolver y se realizó una explicación oral de los objetivos buscados. La resolución del trabajo propuesto comprendió media hora de lectura y discusión grupal. Los escritos producidos fueron evaluados por los docentes de la cátedra. Solo 1/10 grupos no contestó las consignas de esta actividad opcional. En 9/9 de los grupos que contestaron se expresaron acuerdos y desacuerdos con los conceptos vertidos, verificándose justificaciones acertadas y avaladas por los contenidos de la asignatura. En 7/9 se reconocieron los diferentes errores teóricos de los escritos. En 9/9 se presentaron propuestas mejoradoras: simplificar las infografías, complementar los textos con información sobre mecanismos de acción y características de los componentes de los distintos biológicos. En 9/9 se observó al menos un error conceptual. Concluimos que el objetivo planteado fue alcanzado y los resultados indican que, si bien es un proceso en desarrollo en la formación de los estudiantes, el razonamiento y la crítica de la información a la que acceden precisa del estímulo y seguimiento constante por lo/as docentes a los fines de crear el hábito de la lectura y la formulación de la duda como disparador de la reconstrucción de los contenidos abordados y de los valores subyacentes a la oferta comercial de productos biológicos disponibles en la actualidad.

58- Propuesta de un Instrumento de evaluación basado en el ejercicio de hacer preguntas relevantes, apropiadas y sustantivas. Realizado por aspirantes al Programa de Adscripción a la Docencia. Facultad de Cs Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata

Larsen, A^{1,4}, Garassino B^{2,4}, García J^{2,4}, Rodriguez Ramos S^{2,4}, Queirel T³.

¹ Catedra de Inmunología Veterinaria.

² Estudiantes de la carrera de Cs Veterinarias.

³ Área asesoría pedagógica.

⁴ Participantes del Proyecto de Tambos y Cerdos Sanos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

La facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, cuenta con un Programa de Adscripción a la Docencia Universitaria desde el año 2015. El trayecto formativo está dirigido a graduados y estudiantes de esta facultad. Una de las exigencias es desarrollar material didáctico susceptible de ser utilizado en el curso de grado. A principios del corriente año y pasada la única fecha de inscripción anual, estudiantes avanzadas en la carrera y participantes del proyecto de extensión Tambos y Cerdos Sanos, nos plantearon su interés en presentarse a la convocatoria del año próximo 2018 para el curso de Inmunobiología Animal Básica (IAB) ubicado en el primer cuatrimestre del segundo año de la carrera. El curso implementa un sistema de evaluación clase a clase, permitiendo acceder a los estudiantes desde un dispositivo móvil al espacio del Aula Virtual. La propuesta para las alumnas postulantes fue profundizar la metodología de evaluación. Seleccionamos recursos online gratuitos: formulario de Google o Kahoot y Wix, que posibilitan diseñar evaluaciones y página repositorio de trabajos respectivamente. Nuestro propósito fue que las futuras adscriptas profundicen un tema específico del curso de inmunología y comiencen a transponer didácticamente el contenido elegido. Proponemos iniciar un cambio en la metodología de evaluación construyendo un tipo de conocimiento relacional como trayecto de apropiación significativa del contenido. Luego de varios encuentros realizados con las estudiantes interesadas surgió una propuesta de trabajo entre docentes y aspirantes a adscriptos. Se construyó un instrumento de evaluación donde el formulario Google es utilizado como recurso on line para evaluación de proceso. La modalidad refiere a una evaluación autogestionada, se propone la aplicación Kahoot como instancia integradora de evaluaciones que suma además la competencia como incentivo. Las postulantes tuvieron que profundizar en los temas elegidos: generalidades

de inmunidad innata, fagocitosis, proteínas de fase aguda, sistema del complemento. La propuesta de las postulantes para la actividad en clase fue: los estudiantes del curso de IAB deberán realizar preguntas en formato formulario Google sobre temas específicos de inmunidad innata, para ello las postulantes diseñaron un instructivo facilitador para los alumnos. Así mismo diseñaron, planificaron y realizaron el cuestionario Google del primer tema propuesto. Las evaluaciones de los temas deberán ser elaboradas por grupos los estudiantes. El propósito es proponer el ejercicio de "aprender a hacer preguntas relevantes, apropiadas y sustantivas" (Marco Antonio Moreira, 2005). Por último la creación de una página Wix para sociabilizar las autoevaluaciones y demás recursos didácticos utilizados para esta experiencia y de interés de los alumnos, constituye un reto divertido, creativo y motivador. Con este trabajo queremos aplicar algunos de los principios desarrollados por Marco Antonio Moreira (2005) y Paula Carlino (2005): la importancia de la enseñanza basada en el cuestionamiento, la pregunta, la escritura y reescritura de las mismas para lograr que los estudiantes comprendan conceptos e interrelacionen eventos que se dan en la respuesta inmune y estimular el aprendizaje significativo y crítico. También se pretende promover y potenciar las habilidades lingüísticas y semánticas, las competencias de relación interpersonal estimulando la participación y el trabajo colaborativo, indispensable para consolidar la formación de grupo de trabajo entre los estudiantes, ya sean futuros docentes o profesionales veterinarios. En esta experiencia se propuso brindar a los postulantes a adscriptos un espacio para explorarse como futuros docentes planificadores, reflexivos sobre las prácticas docentes para comenzar la construcción de su propio perfil docente. Las producciones de las postulantes a adscriptos se puede observar en este link: <https://garcia8jennifer8.wixsite.com/iabmaslledelaula>

59- Influencia de la aprobación de asignaturas previas y cohortes de procedencia en el desempeño de los estudiantes del curso inmunobiología animal básica

Samus S., Campero L.M., Rambeaud M., Dellarupe A., Gos M.L., Bernstein M., Pardini L., Venturini M.C.*

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Bs. As., Argentina.

*cventuri9@gmail.com

El curso Inmunobiología Animal Básica (IAB) se encuentra ubicado en el primer cuatrimestre del segundo año de la carrera de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El requisito para cursar IAB es tener cursadas las actividades presenciales obligatorias (APOs) de Bioquímica, Microbiología I e Histología. Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la influencia de haber aprobado por promoción o examen final obligatorio (EFI) diferentes cursos previos, correlativos o no, sobre el desempeño de los estudiantes en IAB. También se analizó la relación entre cohorte de pertenencia (ingreso 2016/ingreso 2014-2015) y la aprobación de los cursos correlativos. Al final de la cursada de 2017 se realizó una encuesta voluntaria a través de la plataforma Moodle que contestaron 208 estudiantes sobre un total de 394, en la que se les consultó sobre la aprobación de cursos previos, temáticamente relacionados con IAB. Del total que respondieron la encuesta, el 81% (168/208) había ingresado a la carrera entre los años 2014-2016, y sus datos fueron utilizados para el primer objetivo planteado. El 19% restante (40/208) había ingresado en años anteriores y como el plan de estudio había tenido algunas modificaciones en relación con las asignaturas correlativas, no se incluyeron en el análisis. De los 168 alumnos, el 50% aprobó IAB por promoción, el 36% aprobó el curso adeudando la EFI y el 11% desaprobó. Al analizar la influencia de la aprobación de los cursos correlativos sobre el desempeño de los estudiantes en IAB se determinó que el 35% de los estudiantes (n=57) había aprobado

todos los cursos correlativos y de ellos, el 72% promocionó IAB, el 25% aprobó las APO, y el 3% desaprobó. De los estudiantes que no habían aprobado los tres cursos correlativos (n=104), el 40% promocionó IAB, el 44% aprobó las APO y el 16% desaprobó. Se encontró una asociación estadística entre la aprobación de los cursos correlativos y la promoción de IAB ($p=0,002$). Se analizó además la influencia de la aprobación de Embriología y Anatomía Sistemática, un curso no correlativo, sobre el desempeño de los estudiantes en IAB. El 23% de los estudiantes (n=37) había aprobado el curso y de ellos el 76% promocionó IAB, el 24% aprobó las APOs, mientras que ninguno desaprobó. De los estudiantes que no aprobaron Embriología y Anatomía Sistemática (n=126), el 44% promocionó IAB, el 41% aprobó las APOs y el 15% desaprobó. Se halló asociación estadística entre la aprobación de Embriología y Anatomía Sistemática y la promoción de IAB ($p=0,013$). En la cohorte 2016 (n=94) el 44% de los estudiantes aprobó todos los cursos correlativos, mientras que en la cohorte 2014-2015 (n=69) el 23% aprobó todos los cursos correlativos, a pesar de su mayor permanencia en la carrera. Los estudiantes que cumplieron esta condición tuvieron similar desempeño en IAB independientemente de la cohorte de pertenencia (70% y 75% de promoción respectivamente). De lo descripto anteriormente podemos concluir que la aprobación de los cursos analizados tuvo influencia en el desempeño de los estudiantes de IAB.

SESIÓN ESPECIAL: TRABAJO PREMIADO. COMUNICACIÓN ORAL

Caracterización de péptidos de proteínas implicadas en la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos que generan inmunidad neutralizante y memoria de larga duración

Mosqueda J.^{1*}; Hidalgo-Ruiz M.¹; Mejía-López S.¹; Suarez C.²; Pérez-Serrano RM³; Zaldívar-Lelo de Larrea G³.

¹Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Campus Aeropuerto.

Universidad Autónoma de Querétaro. Carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños, Querétaro, Querétaro, México.

²Animal Disease Research Unit, USDA-ARS, Washington State University, 3003 ADBF, P.O. Box 646630, Pullman, WA 99164, USA; Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA 99164, USA.

³Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Querétaro. Fraccionamiento Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, Qro., México.

* joel.mosqueda@uaq.mx

El proceso de invasión del eritrocito por *Babesia bovis* es similar al de otros protozoarios Apicomplexa. Desde el primer anclaje hasta la internalización completa, los parásitos apicomplexos utilizan proteínas que contienen en sus organelos apicales¹. Muchas de estas proteínas son blancos vacunales, sin embargo, diversos estudios han caracterizado estas proteínas y se ha observado que muchas de ellas contienen epítomos B y T inmunodominantes que son variables entre cepas y son responsables de la incapacidad de vacunas basadas en estos antígenos de inducir una respuesta protectora heteróloga^{2,3}. Una forma de solventar este problema es la identificación de epítomos B y T conservados entre todas las cepas que generen una respuesta tipo Th1, la cual se caracteriza por presencia de células T CD4+ de memoria (CD45RO+/CD62L+) productoras de INF- γ y anticuerpos neutralizantes^{3,4}. Sin embargo, en bovinos con infecciones crónicas por *B. bovis* la producción de INF- γ puede ser inhibida de manera indirecta por la IL-10⁵. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar péptidos conservados con epítomos B y T de las proteínas AMA-1, MSA-2c y RAP-1 que generan una respuesta inmune neutralizante y efectora de larga duración. Para ello, a partir de secuencias de diferentes cepas generadas o previamente publicadas y mediante una estrategia bioinformática inicial, de cada proteína se identificó el péptido señal con los programas SignalP⁶ y SMART⁷, las hélices transmembranales con el programa TMHMM⁸, dominios funcionales con los programas SMART⁷ y PFAM⁹; en las regiones expuestas de las proteínas maduras las regiones inmunogénicas y los epítomos B fueron predichos con los programas ABCpred¹⁰, IEDB¹¹ y BCEpred¹². Se identificaron péptidos en regiones expuestas, conservadas e inmunogénicas y que contienen epítomos B predichos para cada proteína. Los péptidos se generaron por síntesis química en forma de dendrímeros de 8 ramas, fueron diluidos en PBS pH 7.4 y emulsionados en proporción 1:1 con adyuvante montanide ISA 71 VG (Seppic, Francia). Se tomó una muestra de suero pre-inmunización, posteriormente una cantidad total de 100 μ g de cada péptido se inmunizó vía subcutánea en la región sub-escapular en bovinos nacidos y mantenidos en un área libre de garrapatas. Se realizó un total de cuatro inmunizaciones con intervalos de 21 días entre cada una, colectando la muestra de suero post-inmunización 15 días después de la cuarta inmunización. Las muestras de suero fueron evaluadas a una dilución de 1:100 por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para identificar las proteínas nativas en parásitos de *B. bovis* intraeritocíticos fijados en portaobjetos. La detección de los anticuerpos primarios se realizó con proteína G acoplada a

Alexa-488. Un año después de la última inmunización que se realizó en los bovinos se evaluó la respuesta inmune celular de larga duración donde se identificaron porcentajes de poblaciones de células T CD4+ y poblaciones T efectoras (CD4+/CD45RO+) y la cuantificación de citocinas (INF- γ , IL-10 e IL-4), en muestras de sangre periférica. Las muestras de sangre fueron procesadas usando gradientes de densidad (LymphoprepTM) para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). 1x10⁶ PBMC fueron estimulados con 5 μ g/ml de péptido, 5 μ g/ml de Concanavalina A como control positivo y como control negativo se utilizaron células no estimuladas y para medir la producción de citocinas se colectaron sobrenadantes de cultivo a las 18 horas de estimulación y fueron analizadas por Kits de ELISA para cuantificación de INF- γ , IL-10 e IL-4 (MyBiosource®). El cultivo se mantuvo durante 72 horas, a 37°C con 5% de CO₂ y se analizaron las poblaciones de células T CD4+ y T CD4+ / CD45RO+, usando los siguientes anticuerpos de marcaje: anti-CD4 (CC8-Alexa Flour 647: AbD Serotec), anti-CD45RO (IL-A116-RPE: AbD Serotec). El análisis se realizó por citometría de flujo (BD FACSVerserTM). Finalmente, se evaluó la capacidad neutralizante de los anticuerpos contra cada péptido mediante un ensayo de inhibición de la invasión *in vitro*. Este ensayo se realizó a partir de un cultivo celular de eritrocitos de bovino infectados con la cepa T2Bo de *B. bovis* mantenidos a 37°C con 5% de CO₂. El ensayo se realizó por triplicado en placas de 96 pozos de fondo plano, en un volumen final de 200 μ l conteniendo 2.5% de eritrocitos con una parasitemia inicial de 0.2% y 20% del suero a evaluar. Cada 24 horas se realizó cambio de medio y a las 72 horas los porcentajes de eritrocitos parasitados (PEP) se determinaron por citometría de flujo empleando hidroetidina¹³. A partir de los PEP se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada péptido. La diferencia estadística (P<0.05) entre los PEP de los sueros pre y post inmunización fue determinada con una prueba T de Student de muestras independientes. Se identificaron y sintetizaron 14 péptidos en total: 4 péptidos de AMA-1, 5 péptidos de MSA-2c, y 5 péptidos de RAP1. Todos los péptidos son totalmente conservados en todas las cepas reportadas a la fecha. A excepción de los péptidos 4 de AMA-1 y 5 de RAP-1 (P4AMA1 y P5RAP1) que no fueron solubles en PBS pH 7.4, y de los péptidos P1AMA1, P1MSA-2c y P2RAP-1, que no generaron anticuerpos, todos los demás péptidos generaron anticuerpos que identificaron los merozoitos de *B. bovis* por IFI con patrones de tinción similares por proteína (Figura 1). Las células estimuladas con péptidos P2AMA1, P3RAP1Bov y P3MSA2C obtuvieron porcentajes significativos de células T efectoras en comparación con las

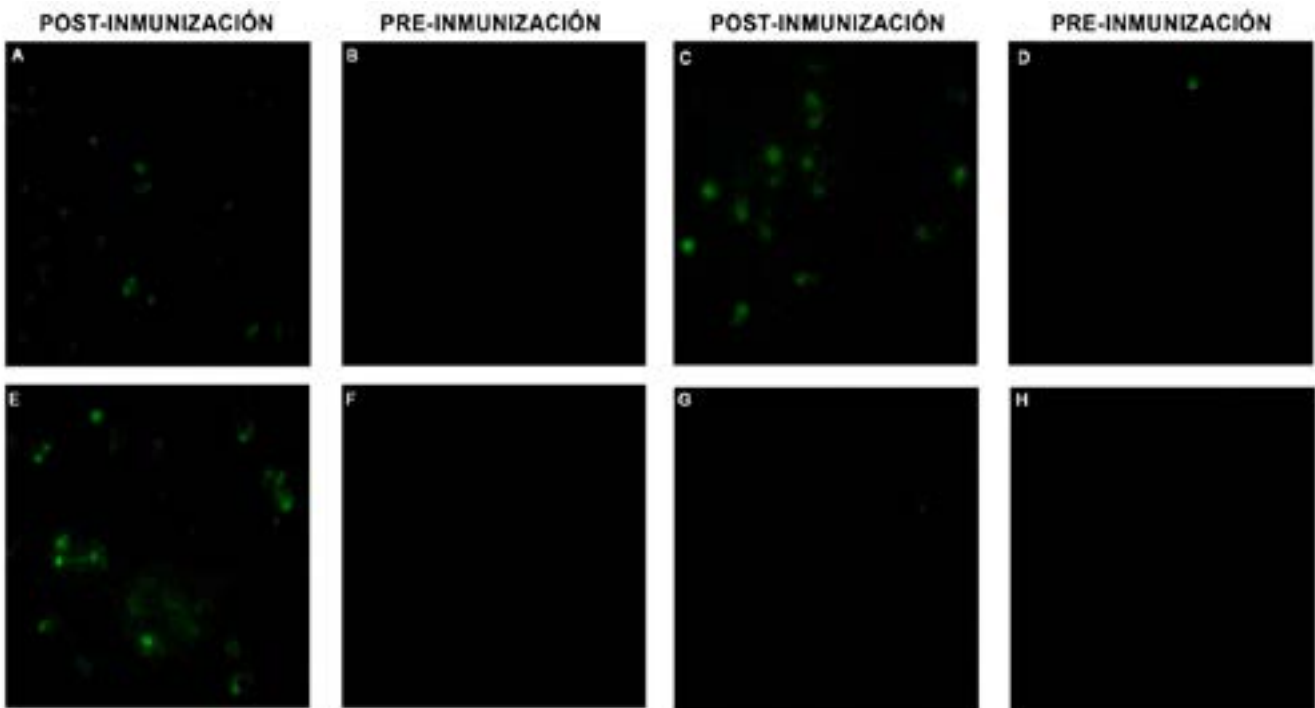


Figura 1. Inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del péptido AMA-1; B) Suero pre-inmunización del péptido AMA-1; C) Suero post-inmunización del péptido MSA-2c; D) Suero post-inmunización del péptido MSA-2c; E) Suero post-inmunización del péptido RAP-1; F) Suero pre-inmunización del péptido RAP-1; G) Suero post-inmunización control (PBS + adyuvante); H) Suero pre-inmunización control (PBS + adyuvante).

no estimuladas, observando las mismas diferencias en la producción de INF- γ , aunque estas diferencias no fueron significativas. La concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo procedentes de las células estimuladas por los péptidos mostraron menor cantidad de IL-10 (Figura 2) en comparación con los sobrenadantes de las células no estimuladas, el péptido que mostró esta diferencia

significativa estadísticamente fue P2AMA1, sin embargo, solo para el péptido P5RAP1 se encontró una mayor concentración de IL-10. Finalmente, se encontró diferencia estadística significativa entre los PEP de los sueros pre y post, excepto para los péptidos P3AMA1, P3RAP1 y para el bovino control, el cual fue inmunizado con una emulsión elaborada sin péptido (Figura 3). Finalmente, los porcentajes

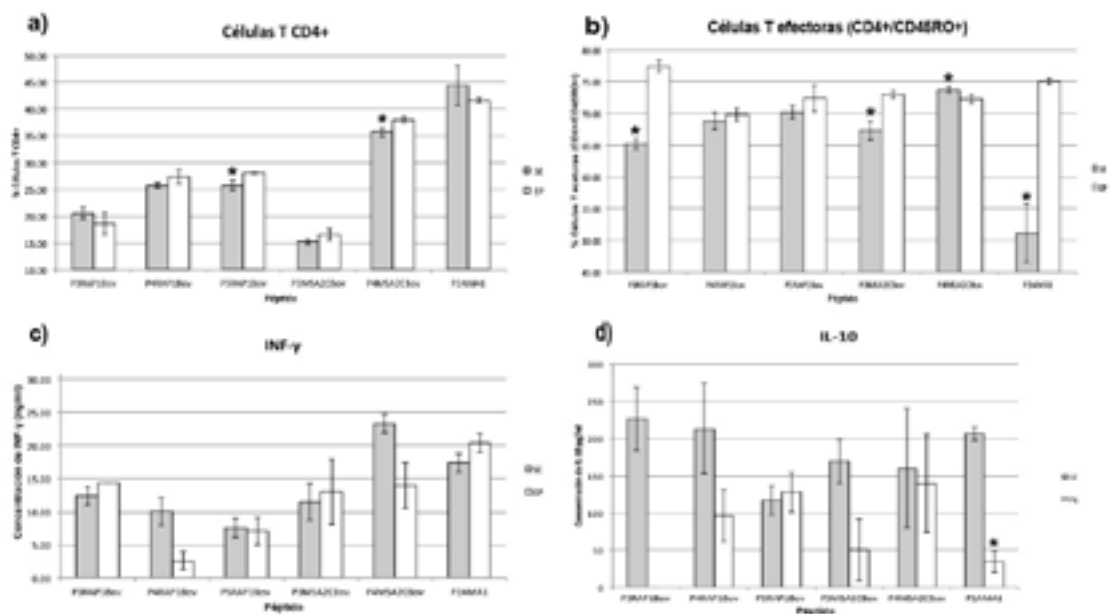


Figura 2. Poblaciones celulares y citocinas. En los gráficos a) y b), se muestran los porcentajes de células T CD4+ y T efectoras (CD4+/CD45RO+) respectivamente, identificadas por citometría de flujo, de 10,000 eventos. En los gráficos c) y d), se muestran la concentración de citocinas INF- γ (c) e IL-10 (d) respectivamente, de sobrenadantes de cultivo. *Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con prueba t-student.

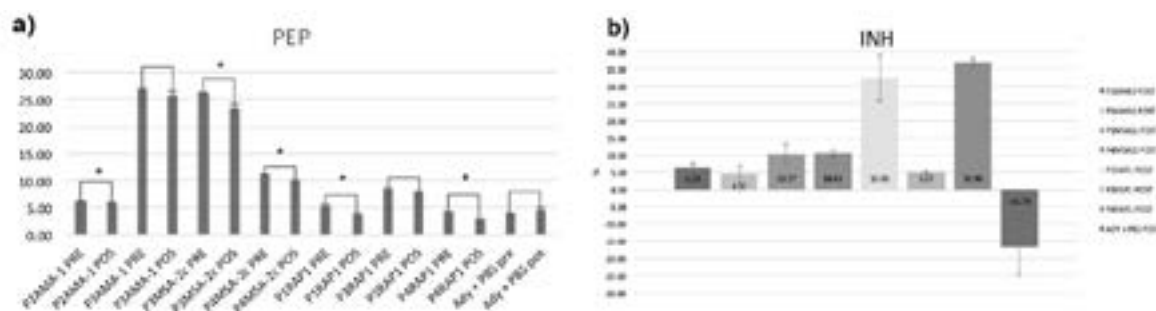


Figura 3. Evaluación *in vitro* de la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados de bovinos inmunizados con péptidos. En el panel a) se muestran los porcentajes de eritrocitos parasitados (PEP) y con un * se indica la diferencia estadística entre el suero pre y post-inmunización. En el panel b) el porcentaje de inhibición generado se indica por cada péptido empleado.

*Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con prueba t-student.

de inhibición generados por los péptidos fueron los siguientes: P2AMA1 6%, P3AMA1 4%, P3MSA2c 10%, P4MSA2c 10.4%, P1RAP1 32%, P3RAP1 5%, y P4RAP1 37% (Figura 3). En este trabajo se logró realizar la identificación de péptidos conservados que generan una respuesta inmune neutralizante y memoria de larga duración. Esta respuesta es variable entre los péptidos de cada proteína y no todos

los epítomos B y T de estas proteínas inducen respuestas humorales y celulares que correlacionan con protección en *B. bovis*. Todos los procedimientos realizados en animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (17FCN2017). Financiado por Conacyt-Ciencia Básica y PRODEP-Redes.

REFERENCIAS

1. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet. Parasitol* 2006; 138:22-32
2. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen, *Parasite Immunol* 2001; 23:463-471
3. Brown W.C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis* a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol* 2001; 101:233-248.
4. Sopp P, & Howard CJ. IFN γ and IL-4 production by CD4, CD8 and WC1 $\gamma\delta$ TCR+ T cells from cattle lymph nodes and blood. *Veterinary immunology and immunopathology* 2001. 81:85-96.
5. Brown WC, Woods VM, Chitko-McKown CG, Hash SM, & Rice-Ficht AC. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infection and immunity* 1994. 62(11):4697-4708.
6. SignalP en: www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
7. SMART en: <http://smart.embl-heidelberg.de>
8. TMHMM en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>
9. PFAM en: <http://pfam.xfam.org>
10. ABCpred en: <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>
11. IEDB en: <http://tools.immuneepitope.org/bcell>
12. BCEpred en: <http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred>
13. Wyatt CR, Goff W, Davis WC. A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *Journal of Immunological Methods* 1991. 140:23-30.

Índice de autores

Autor	resumen N°		
		Kornuta C	11
Aguirre F	51	Kornuta C	52
Alvarez G	39	Lahore R	5
Alvarez G	40	Larsen A	58
Barone L	43	Marcellino R	23
Bidart J	1	Mayon M	7
Blanco FC	48	Mazzuca A	46
Bustos CP	33	Mazzuca A	56
Caggiano N	12	Bigi M	35
Caggiano N	22	Mortola E	53
Camacho P	19	Mosqueda J	18
Campero LM	54	Mosqueda J	44
Campero LM	2	Nuñez S	9
Carignano HA	36	Peralta L	57
Casasnovas G	30	Pintos LA	16
Colombatti Olivieri MA	27	Piskorz AL	37
Cuerda MX	13	Porporatto, C	55
Dellarupe A	17	Porporatto, L	34
Díaz A	10	Rambeaud M	45
Dunleavy MV	42	Reidel IG	6
Gammella M	8	Renna MS	38
Garanzini D	49	Rigo, V	24
García G	41	Rocha RV	25
Grippo L	3	Ruggieri RL	47
Gutiérrez SE	21	Samus S	59
Hecker YP	15	Scian R	31
Hecker YP	14	Seitz J	20
Hermida H	26	Soutullo A.	32
Herzfeld J	4	Van Deer Veen P	28
Klepp L	50	Vélez C	29