



FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



AAIV 2019

XII Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria

7 y 8 de noviembre de 2019 –
Edificio Karakachoff

Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de
La Plata

La Plata - Argentina

LIBRO DE RESÚMENES

COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL

PRESIDENTE:

Dr. Eduardo Mórtola

SECRETARIA GENERAL:

Dra. Alejandra Larsen

SECRETARIA TÉCNICA:

Bact. Graciela Miceli y Dra. Soledad Serena

COLABORADORES:

M.V. Mauro Manfredi; M.V. Marcos Salina y Est. María José Paredes

COMITÉ COLABORADOR

Dra. Ana Jar (UBA)

Dra. Alejandra Capozzo (INTA)

Dra. Adriana Soutullo (Min. Producción Santa Fe, FBCB-UNL)

Dra. Cecilia Greco (AAIV)

Dra. Carolina Vélez (UNLPam)

Dra. Carina Porporatto (UNVM, Córdoba)

Dra. Mónica Fernández (Boehringer Argentina)

Dra. Magdalena Rambeaud (UNLP)

Dra. Leticia Peralta (UNRosario)

COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. Alejandra Capozzo (INTA)

Dra. Cecilia Greco (AAIV)

Dra. Ana Jar (UBA)

Dr. Eduardo Mórtola (UNLP)

Dra. Adriana Soutullo (Min. Producción, Santa Fe, FBCB-UNL)

El Comité Organizador de las XII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria agradece la colaboración de los siguientes profesionales en la evaluación de los resúmenes presentados.

Dra. Ana Jar, Dr. Eduardo Mórtola, Dra. Alejandra Capozzo, Dra. Adriana Soutullo, Dra. Lidia Gogorza, Dra. Cecilia Greco, Dra. Sandra Nuñez, Dra. Soledad Serena, Dra. Carolina Vélez, Dra. Leticia Peralta, Dra. Magdalena Rambeaud, Dra. Estela Vera, Dra. Andrea Dellarupe, Dra. Patricia Zamorano.

El Comité Organizador de las XII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria agradece a aquellas personas, instituciones y empresas que han brindado apoyo a su realización.

AUSPICIANTES

SECRETARÍA DE
CIENCIA Y TÉCNICA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Boehringer
Ingelheim



Biogénesis Bagó

COMISIÓN DIRECTIVA DE LA AAIV – PERÍODO 2017-2019

PRESIDENTE:

Ana Jar (UBA)

VICE-PRESIDENTE:

Eduardo Mórtola (UNLP)

SECRETARIA:

Alejandra Capozzo (INTA)

PROSECRETARIA:

Mónica Fernández (Boehringer Argentina)

TESORERA:

Adriana Soutullo (Min. Producción Santa Fe)

REVISORA DE CUENTAS:

Silvia Colavecchia (UBA)

SECRETARIA DE ACTAS:

Olga Sánchez Negrette (UCASal)

VOCAL 1º:

Lidia Gogorza (UNRN)

VOCAL 2º:

Sandra Núñez (UNNE)

VOCAL 3º:

Estela Vera (UNL)

VOCAL 4º:

Carolina Vélez (UNLPam)

VOCAL SUPLENTE 1º:

Patricia Zamorano (INTA)

VOCAL SUPLENTE 2º:

Analía Mazzuca (UCASal)

VOCAL SUPLENTE 3º:

Leticia Peralta (UNR)

VOCAL SUPLENTE 4º:

Carina Porporatto (UNVM)

JORNADAS CIENTÍFICAS ANTERIORES DE LA AAIV

- Primeras Jornadas y Reunión Anual. 2008, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Sociedad de Medicina Veterinaria).
- Segundas Jornadas y Reunión Anual. 2009, Rosario - Santa Fe (Colegio de Médicos Veterinarios de la Provincia de Santa Fe, 2ª Circunscripción).
- Terceras Jornadas y Reunión Anual. 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Sociedad de Medicina Veterinaria).
- Cuartas Jornadas y Reunión Anual. 2011, Río Cuarto - Córdoba (Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto).
- Quintas Jornadas y Reunión Anual. 2012, Esperanza - Santa Fe (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral).
- Sextas Jornadas y Reunión Anual. 2013, Casilda - Santa Fe (Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto).
- Séptimas Jornadas y Reunión Anual. 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires).
- Octavas Jornadas y Reunión Anual. 2015. Tandil - Buenos Aires (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires).
- Novenas Jornadas y Reunión Anual. 2016, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Sociedad de Medicina Veterinaria).
- I Simposio Internacional y Décimas Jornadas y Reunión Anual. 2017, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires).
- Undécimas Jornadas y Reunión Anual. 2018, Salta (Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, UCASaL).

PROGRAMA DE LAS JORNADAS

JUEVES 7 DE NOVIEMBRE

09.00 a 09.30 h:	Inscripción y Acreditación
09.30 a 10.00 h:	Ceremonia de apertura Palabras del Sr. Decano de Facultad de Cs. Veterinarias de La Plata: Dr. Marcelo Pecoraro Palabras de la Presidente de la SOMEVE: Dra. Mabel Basualdo Palabras de la Presidente de la AAIV: Dra. Ana Jar
10.00 a 11.00 h:	Conferencia inaugural <i>La especificidad de la prueba de tuberculina es modificada por el uso del cóctel proteico ESAT-6 + CFP-10 en ganado bovino infectado naturalmente por Mycobacterium bovis.</i> Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México. Moderador: Dra. Ana Jar
11.00 a 11.30 h:	Coffee-break
11.30 a 12.30 h:	Sesión Poster-pitch I: Diagnóstico e Inmunología Clínica Moderador: Dra. Alejandra Larsen
12.30 a 14.00 h:	Almuerzo libre
14.00 a 15.30 h:	Mesa Redonda sobre Paratuberculosis Bovina <i>"Paratuberculosis en el contexto mundial y en Argentina"</i> Dr. Fernando Paolicchi, INTA Balcarce <i>Respuesta inmune celular y humoral en rodeos con paratuberculosis bovina.</i> Dr. Gabriel Travería, FCV, UNLP <i>Evaluación de alternativas diagnósticas para identificación de la paratuberculosis subclínica.</i> Dra. Ana Jolly, FCV, UBA <i>Desarrollos biotecnológicos para el control de la paratuberculosis bovina.</i> Dra. María Isabel Romano, Instituto de Biotecnología de INTA Castelar Moderador: Dra. Ana Jar
15.30 a 16.00 h:	Coffee-break
16.00 a 17.00 h:	Espacio de Empresas Innovadoras <i>Avances en Vacunas Vectorizadas.</i> Dr. Ángel Menéndez, Boehringer Ingelheim <i>Vedevax Block: desarrollo y resultados a campo de la primera vacuna a subunidad direccionada del mundo para la diarrea viral bovina.</i> Dr. Demián Bellido, Vetanco Moderador: Dr. Eduardo Mórtola
17.00 a 18.00 h:	Sesión Poster-pitch II: Diagnóstico e Inmunología Clínica Moderador: Dra. Magdalena Rambeaud
18.30 a 20.00 h:	Coro Juvenil de la UNLP Cocktail de Bienvenida

VIERNES 8 DE NOVIEMBRE

09.30 a 10.00 h:	Inscripción y Acreditación
10.00 a 11.00 h:	Conferencia Plenaria <i>Desarrollo de herramientas inmunoprolácticas y diagnósticas para el control de la brucelosis.</i> Dr. Diego J. Comerci, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas Dr. Rodolfo A. Ugalde, IIB-UNSAM Moderador: Dra. Leticia Peralta
11.00 a 11.30 h:	Coffee-break
11.30 a 12.30 h:	Sesión Poster-pitch III: Inmunointervención y Vacunas Moderador: Dra. Carolina Vélez
12.30 a 14.00 h:	Almuerzo libre. Asamblea Anual de la AAIV
14.00 a 14.30 h:	Sesión Poster-pitch IV: Respuesta Inmune a Infecciones Moderador: Dra. Adriana Soutullo
14.30 a 15.30 h:	Conferencia Plenaria <i>La innovación docente en Inmunología Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid.</i> Dra. María del Mar Blanco Gutiérrez, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, España Moderador: Dra. Carina Porporatto
15.30 a 16.00h:	Coffee-break
16.00 a 16.30 h:	Sesión Oral: Enseñanza de la Inmunología Veterinaria
16.30 a 17.30 h:	Mesa Debate sobre Docencia en Veterinaria Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, UNAM, México Dra. María del Mar Blanco Gutiérrez, UCM, España Moderador: Dra. Carina Porporatto
17.30 h:	Ceremonia de cierre Conclusiones del evento a cargo del Presidente de las XII Jornadas y Reunión Anual: Dr. Eduardo Mórtola

RESÚMENES

ÁREAS TEMÁTICAS

Posters	Páginas
SESIÓN I: DIAGNÓSTICO E INMUNOLOGÍA CLÍNICA (1A – 10A)	20-29
SESIÓN II: DIAGNÓSTICO E INMUNOLOGÍA CLÍNICA (1B – 9B)	30-38
SESIÓN III: INMUNOINTERVENCIÓN Y VACUNAS (1C – 12C)	39-49
SESIÓN IV: RESPUESTA INMUNE A INFECCIONES (1D – 6D)	50-55
SESIÓN ORAL: ENSEÑANZA DE LA INMUNOLOGÍA VETERINARIA (1E – 3E)	56-58

SESIÓN I: DIAGNÓSTICO E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

1A. VARIACIÓN DEL NIVEL DE ANTICUERPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII EN CABRAS GESTANTES

Steffen K.D.^{1,3*}; Gos M.L.^{1,2}; Gortari C.L.⁴; Arias R.O.³; Moré G.^{1,2}; Venturini M.C.¹

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV-UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

² Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Bs. As., Argentina.

³ Curso de Introducción a la Producción Animal, FCyF-UNLP, La Plata, Bs. As. Argentina.

⁴ Cátedra de Farmacología Especial y Toxicología, FCV-UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

*ksteffen@fcv.unlp.edu.ar

La toxoplasmosis es producida por *Toxoplasma gondii*, un protozooario Apicomplexa de distribución mundial, considerado una importante causa de abortos y nacimientos de cabritos débiles. La presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* se relaciona directamente con la exposición e infección con el parásito. La infección crónica puede reactivarse ante cambios hormonales o inmunológicos, tal como sucede durante la gestación, de modo que los estadios de división lenta (bradizoítos) pueden multiplicarse activamente (taquizoítos) en diferentes tejidos, sin mediar nuevas infecciones. Los métodos serológicos más difundidos para el diagnóstico son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Ambos, permiten la cuantificación o titulación de anticuerpos en muestras de suero y el diagnóstico en los animales en pie. El objetivo de este trabajo fue detectar variaciones del título de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* entre el segundo tercio de la gestación y el parto en cabras. Se obtuvieron muestras de suero de 14 cabras adultas preñadas pertenecientes a la Unidad Experimental Caprina de Facultad de Ciencias Agrarias y Forestal de la Universidad Nacional de La Plata. Se realizaron dos muestreos: uno en el segundo tercio de la gestación (G) y el otro al momento del parto (P). Las muestras, en portaobjeto, fueron analizadas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP, utilizando como antígeno

la cepa RH de *Toxoplasma gondii* y conjugado anti-IgG de cabra comercial hasta título final. Todas las cabras (100%) resultaron seropositivas mediante la inmunofluorescencia indirecta a *Toxoplasma gondii*. En el muestreo G la distribución de títulos fue la siguiente: 100 (1), 400 (3), 800 (2), 1600 (1), 6400 (3), 12800 (2), 25600 (2); y en el muestreo P: 400 (1), 800 (1), 1600 (3), 6400 (3), 12800 (3) y 25600 (3). El 42,8% (6/14) y el 14,3% (2/14) de las cabras analizadas evidenciaron seroconversión positiva y negativa, respectivamente. El 28,6% (4/14) mantuvo títulos altos (≥ 6400) y el 14,3% (2/14) presentó variaciones de títulos intermedios (400 y 800). En el presente trabajo se evidenció un 100% de seropositividad en un pequeño hato caprino experimental. Se detectó seroconversión en más de la mitad de los animales entre el segundo tercio de la gestación y el parto. Estos datos sugieren la presencia de reactivaciones o reinfecciones de *Toxoplasma gondii* alrededor del último tercio de la gestación. Es posible sugerir que los títulos altos y las seroconversiones se asocian a un menor control de la multiplicación rápida de los protozoos intracelulares, por consiguiente aumentaría la probabilidad de transmisión transplacentaria de taquizoítos y eventualmente su aparición en calostro y leche. Sería conveniente desarrollar estudios para determinar si existe asociación entre la seroconversión y el nacimiento de cabritos débiles o asintomáticos pero infectados.

2A. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD DE BIOMARCADORES DE TUBERCULOSIS BOVINA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE PARATUBERCULOSIS BOVINA

Klepp L.¹; Colombatti A.¹; Moyano D.¹; Malovrh T.²; Gruntar I.²; Ocepek M.; Romano M.I.; Blanco F.¹; Bigi F.¹

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

² Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.

*klepp.laura@inta.gob.ar

La tuberculosis bovina (TBb) es una importante enfermedad animal y zoonótica que causa pérdidas financieras significativas y constituye un riesgo para la salud pública. El patógeno, *Mycobacterium bovis*, se transmite del ganado a los seres humanos a través de aerosoles o ingestión de productos lácteos contaminados. En un trabajo previo (Klepp *et al.* 2019) nuestro grupo identificó y validó a campo biomarcadores cuyo nivel de expresión cambia en bovinos infectados con TBb en relación a animales sanos (CXCL9, CXCL10, THBS1, MMP9, IL-22 e IFN γ). Además, observamos que la expresión de los marcadores CXCL10 e IL-22 permite distinguir entre animales con TBb negativos para los tests de intradermorreacción y de liberación de IFN γ (técnicas diagnósticas de TBb) de los animales sanos. De este modo, concluimos que CXCL10 e IL-22 constituyen biomarcadores que podrían complementar las dos pruebas diagnósticas de TBb actualmente empleadas. Para continuar con la caracterización de estos biomarcadores, decidimos evaluarlos también como predictores de paratuberculosis (MAP). MAP es una enfermedad de alta prevalencia distribuida en todo el mundo y causada por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis. Dado que MAP y TBb están estrechamente relacionadas en términos de patología y respuesta inmune y se ha descrito una relación cruzada significativa en sus diagnósticos (Eirin *et al.* 2015), nos propusimos evaluar el uso de CXCL9, CXCL10, THBS1, MMP9, IL-22 e IFN γ , así como de otros biomarcadores previamente identificados (IL17, IL1R, FYVE

y CD14) como predictores de MAP en el ganado vacuno. Para ello, se tomaron muestras de sangre de 18 animales presentes en un campo de alta prevalencia de MAP. De las muestras de sangre se extrajeron células mononucleares de sangre periférica y se estimularon con antígenos de MAP (PPDa), con antígenos de TBb (PPDb), o con PBS (grupo sin estimular). A dichas muestras se les realizó un ELISA para la detección de animales con MAP y observamos que 6 dieron positivos. De los animales que resultaron positivos para el test de ELISA se extrajo RNA, se preparó cDNA y se analizó la expresión de los distintos biomarcadores mediante PCR cuantitativa. Asimismo, se muestrearon 6 animales sanos provenientes de Eslovenia. Dado que los biomarcadores en estudio ya fueron estudiados en animales con TBb (Klepp *et al.* 2018), la muestra de cada animal se estimuló, además de con PPDa, con PPDb para evaluar la posible infección con TBb. De los 12 animales analizados, observamos que sólo uno se encuentra posiblemente infectado con *M. bovis*. Por otro lado, al estimular con PPDa sólo el biomarcador THBS1 mostró diferencias significativas en los valores de *fold change* entre animales con MAP y animales sanos. Estos resultados indican que el biomarcador THBS1 probablemente pueda emplearse como herramienta en el diagnóstico de MAP, mientras que los restantes biomarcadores validados como predictores de TBb parecen ser exclusivos de tuberculosis.

3A. AVANCES HACIA EL DESARROLLO DEL PRIMER SISTEMA DIAGNÓSTICO NACIONAL MEDIANTE DOBLE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR PARA LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

Picotto L.D.^{1,2}; Fuentealba N.A.^{1,2}; Sguazza G.H.²; Cavalitto S.F.^{1,3}; Echeverría M.G.^{1,2}; Panei C.J.^{1,2*}

¹ CONICET, Argentina.

² Laboratorio de Virología, FCV-UNLP, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

³ Área Biotecnología, FCE-UNLP, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

* javierpanei@fcv.unlp.edu.ar

Los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) incluyen al virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV) y al virus Visna/Maedi (VMV). Éstos producen enfermedades multisistémicas que pueden derivar en la muerte del animal infectado. Debido a su impacto sanitario, estas enfermedades son de denuncia obligatoria en la Argentina. La prueba de ELISA de IDEXX es el único método aceptado como diagnóstico oficial para la detección de anticuerpos contra SRLV en Argentina. Sin embargo, el alto costo de importación hace que sea imposible su uso rutinario. De acuerdo a la OIE, además del ELISA, la técnica de doble inmunodifusión en gel de agar (IDGA) se utiliza como método de detección de anticuerpos contra los SRLV y ha sido empleada en varios países como método oficial de detección. El genoma del CAEV presenta dos cadenas de ARN idénticas que se transcriben a ADN complementario (ADNc), el cual se inserta en el genoma de la célula huésped como provirus. Éstos poseen genes estructurales denominados *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para una poliproteína que se cliva en tres proteínas: de cápside (CA), de nucleocápside (NC) y de matriz (MA). Los epítopes inmunodominantes de CA y MA inducen una fuerte respuesta inmunológica, lo que permite la elaboración de equipos de diagnóstico utilizando estas proteínas como antígenos virales. Sin embargo, las variaciones que se producen en estas regiones génicas presentan un inconveniente para la sensibilidad diagnóstica, por lo que el desarrollo de equipos de diagnóstico utilizando las cepas que circulan en cada región o país es de particular interés. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue producir la poliproteína Gag del CAEV en *Escherichia coli* (*E. coli*) y evaluarla como antígeno para el desarrollo

de una técnica de IDGA para la detección de anticuerpos contra SRLV. Utilizando como molde el ADNc obtenido del primer aislamiento del CAEV en Argentina (Panei y col., 2017), se expresó en *E. coli* la poliproteína Gag completa fusionada a la proteína de unión a la maltosa (MBP), que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad. Una vez purificada, fue evaluada como antígeno viral en placas de Petri conteniendo una solución de Tris 0,05 M, NaCl 8.0% a pH 8 con el agregado de 1% agar granulado. Se realizaron perforaciones utilizando un sacabocados de siete pocillos donde se sembraron 50 microlitros de cada reactivo. Como controles positivos, se utilizaron sueros caprinos y ovinos previamente analizados por la técnica de ELISA de referencia. Las placas de IDGA fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48-72 horas en cámara húmeda y leídas para su interpretación. Se comprobó la aparición de líneas de precipitación entre los sueros controles positivos y el antígeno recombinante. Además, se observó identidad total entre los sueros controles y los sueros de los animales positivos a SRLV detectados, sin visualizarse líneas de precipitación inespecíficas con ninguno de los sueros ensayados. Si bien son necesarios estudios con mayor cantidad de sueros para poder determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba diagnóstica evaluada, los resultados obtenidos sientan una base para poder implementar un sistema de diagnóstico específico y económico que permita incrementar el control serológico en la región, utilizando la técnica de IDGA como *screening* en programas de erradicación de los SRLV en Argentina.

4A. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DEL ANTAGONISTA DE PROGESTERONA EN GLÁNDULAS MAMARIAS CANINAS

Vaquero P.G.^{1,2}; García M.G.²; Lacolla D.V.^{1,2}; Velez C.^{2,4}; Audisio S.A.^{1,2}; Brizotto B.¹; Corrada Y.³; Torres P.A.^{1,2*}

¹ Universidad Nacional de Río Negro. Escuela de Medicina Veterinaria y Producción Agroindustrial. Choele Choel. Río Negro. Argentina.

² Universidad Nacional de la Pampa. Facultad de Ciencias Veterinarias. General Pico. La Pampa. Argentina.

³ Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. La Plata. Buenos Aires. Argentina.

⁴ CONICET. *

email-ptorres@unrn.edu.ar

Los tumores mamarios caninos, son los más frecuentes en la perra y el par mamario inguinal es el más comprometido (Chau y col., 2013). Los altos niveles séricos de progesterona, en la fase lútea o perras castradas, favorecen su promoción. Para evaluar la acción del aglepristone, un antagonista de la progesterona, como potencial antitumoral, se utilizaron biopsias de tejido mamario de las glándulas inguinales, donde se analizó la variación de la expresión de los receptores de progesterona (RP) y de Ki-67, un marcador de proliferación, con valor pronóstico en neoplasias. Se utilizó una población de 20 perras en fase lútea (progesterona sérica: >2ng/ml; n=20), distribuidas en los protocolos terapéuticos: Aglepristone (Alizine, Virbac), 10 mg/kg/, subcutánea; (AGLE; n=10) o Placebo (PLA, n=10). Se tomaron biopsias bajo anestesia general de mama derecha (día -1; n=20), luego de 15 días, de mama izquierda, con ovariectomía homolateral. Se procesaron por técnica para microscopía óptica y se montaron en portaobjetos positivados Genex®. Para estudiar la expresión de RP y antígeno Ki-67 por inmunohistoquímica (Ramos Vara, 2005), se hidrataron en alcoholes de graduación decreciente. Se lavaron en buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4. Se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3% en PBS, se realizó la recuperación antigénica en microondas, con buffer citrato 0,01 Molar, pH 6.0 y se lavó con PBS. Se bloqueó la biotina endógena (Avidin-biotin-blocking-reagents, Cell Marque); y se lavó con PBS. Para bloquear los anticuerpos inespecíficos se incubó con suero equino diluido en PBS (1/100) a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó el anticuerpo primario (anti-RP; Pr88, o el antígeno monoclonal Ki-67 NCL Leica), luego se lavó con PBS. Se incubó con anticuerpos secundarios biotinilados, inmunoglobulina anti, anticuerpos de conejo, ratón y cabra (Cytoscan), y se colocó estreptavidina-peroxidasa (Cytoscan), con lavados con

PBS. Se reveló con solución cromógena diaminobenzidina (DAB Substrate Kit) bajo control de microscopio y corte de coloración con agua corriente. El contraste se obtuvo con hematoxilina activada (Biopur). Se las deshidrató con alcoholes de graduación creciente, y luego en xilol hasta el montaje con Canadax®, Biopur y se observó al microscopio contando inmunomarcaciones de RP y Ki-67, (8 campos a 1000 aumentos). Se calculó el porcentaje de células con inmunoexpresión contando los núcleos positivos (marrones) y negativos de 100 células. Las diferencias de las medias se compararon por test de Student (día -1 vs. 14). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. Se realizó la prueba T para dos medias relacionadas. Los valores de progesterona sérica oscilaron entre los 52,15 y 10,74 ng/ml en ambos grupos AGLE y PLA ($p < 0.05$). Durante el tratamiento con aglepristone disminuyó el valor sérico de la progesterona, la diferencia fue significativa ($p < 0.0001$), también se observó disminución de la expresión de receptores de progesterona en tejido mamario de perras ($p < 0.031$) y de la inmunoexpresión de Ki-67 ($p < 0.0001$). El tratamiento con aglepristone evitaría el papel proliferativo de la progesterona a través de sus receptores al disminuir la expresión del marcador de proliferación. También explicaría que la glándula mamaria normal responde a la señal de progesterona y queda condicionada a patrones de expresión de su receptor en un normal desarrollo o podría derivar a procesos tumorales. El modelo es apto para evaluar otros adyuvantes antitumorales en tejido mamario normal. El aglepristone es seguro, sin efectos colaterales. Este antiprogéstágeno surge como potencial adyuvante en el tratamiento de perras con tumores mamarios y garantiza futuros estudios en la especie.

5A. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO APLICADO AL DOSAJE DE GLIFOSATO EN LECHE CRUDA

Arias N.*¹; Colombero M.¹; Gonzalez M.²; Ingnoli C.²; Soutullo A.¹

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

² Laboratorio Regional de Servicios Analíticos, ALECoL, Esperanza, Santa Fe, Argentina. *

ariasnadiasf@gmail.com

Tradicionalmente las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) se han empleado para la detección y/o cuantificación de anticuerpos o antígenos en infecciones microbianas del ganado. Dada la gran sensibilidad analítica de esta técnica, hoy es posible su uso para cuantificar, además, residuos de plaguicidas en leche y otro tipo de matrices. La provincia de Santa Fe cuenta con la mayor cuenca láctea del país asentada en áreas geográficas destinadas a la agricultura, debido a la riqueza de su suelo. Desde la década del 90 se han implementado los cultivos transgénicos concomitante con la aplicación de agroquímicos, entre los más empleados el glifosato. De allí que el ganado lácteo esté permanentemente expuesto a estos plaguicidas y con ello, a sus posibles efectos tóxicos. En el presente trabajo se pretende cuantificar residuos de glifosato en muestras de leche cruda provenientes de tambos de nuestra provincia de modo de evaluar su inocuidad. Para ello, se localizaron aquellos distritos de la cuenca lechera con mayor cantidad de tambos lindantes a plantaciones agrícolas y notificaciones de mortandad de abejas en apiarios por aplicación de agroquímicos. Se analizaron 41 muestras de leche cruda de tanque, de tambos ubicados en la región definida, 39 de la Provincia de Santa Fe y 2 de Entre Ríos, utilizando un inmunoensayo enzimático de competición comercial (Abraxis) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente las leches se derivatizaron y luego en una placa de ELISA, recubierta por anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, las muestras se incubaron conjuntamente con un anticuerpo de conejo, anti-glifosato. Al adicionar una solución de glifosato de concentración

conocida y conjugado a la enzima peroxidasa, se estableció la reacción de competición con el glifosato de la muestra a cuantificar. Luego de incubar y lavar, se puso en evidencia mediante una reacción de color azul, siendo su intensidad inversamente proporcional a la concentración de glifosato presente en la muestra. La misma se determinó midiendo la densidad óptica e interpolándola en una curva de calibrado, realizada con soluciones estándares brindadas por el fabricante. Las concentraciones de glifosato halladas en las 41 muestras estuvieron comprendidas en el rango de determinación del kit (0,075 a 4 mg/L), siendo el valor medio 0,086 +/- 0,0149 mg/L. En 9 de ellas se encontraron valores superiores al establecido como límite por el Codex Alimentario Argentino ($\geq 0,103$ mg/L), con un valor medio de 0,112 +/- 0,007 mg/L, procedentes de los distritos Santo Tomé, Villa Trinidad, San Carlos Sud, San Carlos, Suardi y Seguí. En otras 10 muestras, si bien están por debajo del límite establecido, sus valores oscilaron entre 0,085 mg/L y 0,102 mg/L. Si bien la metodología del ELISA no es confirmatoria y requiere de otra técnica como la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para confirmar los resultados de las muestras que requieren una acción regulatoria, es posible su aplicación no solo para cuantificar la presencia de glifosato en una mayor cantidad de tambos sino también, a futuro, determinar su concentración en mieles de estas regiones. Ello permitiría implementar acciones sanitarias tendientes a que los productos de nuestra tierra no contengan residuos de agroquímicos o bien estén dentro de los valores establecidos por las normativas vigentes, dado que pueden afectar tanto la salud humana, animal y ambiental.

6A. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN TEST DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PORCINA

Cuerda M.X.¹; Moyano R.D.¹; Alonso M.N.¹; Griffa N.¹; Colombatti Olivieri M.A.¹; Mon M.L.¹; Romano M.I.¹; Santangelo M.P.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO, UE INTA-CONICET), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

*cuerda.maria@inta.gob.ar

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. 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 en el animal en pie es la intradermorreacción, que es de adhesión voluntaria y resulta con considerables falsos positivos y negativos en las piaras, siendo el diagnóstico de certeza el aislamiento bacteriano a partir de lesiones compatibles con tuberculosis detectadas en frigorífico. Por lo tanto, la información existente sobre el estado sanitario para la TBp en los establecimientos porcinos no se conoce, no existiendo un método eficaz para su diagnóstico. La detección de anticuerpos a partir de un test serológico resulta en una herramienta valiosa para el monitoreo y control de TB en cerdos. En este trabajo nos propusimos desarrollar un test de ELISA, y su posterior validación, para el diagnóstico de tuberculosis en establecimientos porcinos. Para el desarrollo del ELISA se utilizó como antígeno un extracto celular de *M. bovis* AN5 el cual fue adsorbido en placas de ELISA Nunc MaxiSorp de 96 pocillos. Para evitar interacciones inespecíficas las placas fueron bloqueadas con leche en polvo al 5%. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/200, por duplicado, y como sistema de revelado se utilizó anti-IgG porcina conjugado a HRP (Sigma®) con ABTS. Se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) a $\lambda=405\text{nm}$. Como controles positivos se utilizaron sueros de

cerdos experimentalmente infectados, y confirmados por necropsia, y como controles negativos sueros de cerdos provenientes de establecimiento libres de TBp. Para la validación de la técnica se realizaron 20 réplicas utilizando 5 sueros positivos (cerdos experimentalmente infectados), 5 negativos (establecimientos libres de TBp), 5 de otras especies animales y solución fisiológica como blanco. Se determinó el coeficiente de variación. Posteriormente se estableció un punto de corte preliminar utilizando 140 sueros provenientes de establecimiento libres de TBp. En forma paralela se probaron los mismos sueros utilizados para el desarrollo y validación de la técnica, en un test de ELISA comercial para diagnóstico de TBp. El coeficiente de variación obtenido para la validación fue menor a 0,25. El punto de corte se estableció como el promedio de los valores de DO corregida ($DO_x - DO_{\text{blanco}}$) más dos desvíos estándar, resultando en un valor de 0,2. Por otra parte, pudimos comparar los valores de DO obtenidos en nuestro test con aquellos obtenidos con el ELISA comercial, estableciendo una correlación mayor a 0,9 (R^2) entre ambas técnicas. Si bien se sabe que el estudio serológico para la detección de tuberculosis en cerdos por sí solo no es suficiente, resulta en un método eficaz para estudiar el estado sanitario de los rodeos porcinos. En este trabajo pudimos desarrollar un ELISA capaz de detectar sueros de animales verdaderamente positivos, y de encontrar como negativos aquellos provenientes de establecimientos libres de TBp.

7A. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN TEST DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS

Moyano R.D.¹; Alonso, M.N.¹, Romero M.A.²; Griffa N.¹, Alvarado Pinedo F.², Traveria G.E.², Romano, M.I.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, IABIMO, Castelar, Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Diagnóstico Veterinario, CEDIVE, Chascomús, Buenos Aires, Argentina. *

cuerda.maria@inta.gob.ar

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico, causada principalmente por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). A nivel mundial, MAP causa grandes pérdidas económicas en la producción bovina, y además podría tener un posible rol zoonótico. Actualmente, el diagnóstico utilizado para paratuberculosis en el animal en pie es el ELISA, siendo el diagnóstico de certeza el aislamiento bacteriano a partir de materia fecal. Uno de los principales problemas del diagnóstico humoral es la interferencia con infecciones con otras micobacterias del complejo avium y/o del complejo tuberculosis, por lo cual existe mucho interés en la búsqueda de nuevos antígenos diferenciales para mejorar las características del diagnóstico. En este trabajo nos propusimos desarrollar y validar un test de ELISA utilizando poliproteínas con epitopes B de proteínas antigénicas de MAP para el diagnóstico diferencial de paratuberculosis. Para el desarrollo del ELISA se utilizó como antígeno una poliproteína recombinante en base a epitopes B de tres proteínas antigénicas de MAP, el cual fue adsorbido en placas de ELISA Nunc MaxiSorp de 96 pocillos. Para evitar interacciones inespecíficas las placas fueron bloqueadas con gelatina porcina al 0.5%. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/200 por duplicado, y como sistema de

revelado se utilizó Proteína-G conjugado a HRP (Biorad®) con ABTS. Se realizó la lectura de la densidad óptica a $\lambda=405\text{nm}$. Como controles positivos se utilizaron sueros de bovinos infectados, confirmados por cultivo bacteriológico, y como controles negativos sueros de bovinos provenientes de establecimientos libres de MAP. Para la validación de la técnica se realizaron 20 réplicas utilizando 5 sueros positivos, 5 negativos y 5 de otras especies animales. Se determinó el coeficiente de variación. Posteriormente se estableció un punto de corte utilizando curvas ROC. El coeficiente de variación obtenido para la validación fue menor a 0,25. El punto de corte se estableció mediante curvas ROC. Se analizaron sueros de animales positivos a tuberculosis (n=15) y paratuberculosis (n=65) y animales de establecimientos libres (n=100), detectándose únicamente los positivos a MAP. Se sabe que el estudio serológico para la detección de paratuberculosis en bovinos es de gran importancia, y que los test convencionales presentan reacción cruzada con sueros positivos a tuberculosis. El presente test logró detectar solo sueros positivos a MAP, diferenciando así los animales con paratuberculosis de aquellos con tuberculosis.

8A. IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN CON SEROALBÚMINA BOVINA EN LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

Duarte J.¹; Barnech M.L.¹; Jolly A.¹; Goldman L.H.¹; Fontanals A.M.¹; Mundo S.L.¹; Jar A.M.¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias.

*jduarte@fvet.uba.ar

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa crónica y progresiva causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). La prueba de oro para el diagnóstico es el cultivo de materia fecal y el aislamiento de MAP, que tiene un 100% de especificidad pero una baja sensibilidad, y además es dificultosa y costosa. El uso de anticuerpos monoclonales (MoAbs) anti-MAP resulta importante para concentrar la micobacteria a partir de muestras de materia fecal y mejorar el diagnóstico de la paratuberculosis. En la Cátedra de Inmunología se habían producido varios hibridomas a partir de la inmunización de ratones con un polipéptido recombinante correspondiente a p34, una proteína de membrana de MAP (p34-r). Los líquidos ascíticos se encontraban congelados a -70°C y habían sido caracterizados parcialmente. El objetivo del proyecto en el que se incluye este trabajo es completar la caracterización de los anticuerpos monoclonales (MoAbs) anti-MAP y determinar su utilidad en la inmunocaptura de MAP a partir de las heces. En el proceso de caracterización, el primer paso fue confirmar la especificidad de seis MoAbs, identificados como A4C9, 1A6, 1B1, 6B3, 6B12 y 6D12. Encontramos que en las pruebas de ELISA, los MoAbs 6B3 y A4C9 mostraban señales positivas frente a p34-r (D.O. $\geq 0,400$), mientras que 1A6 y 6B12 daban una señal baja (D.O. $\leq 0,250$); por su parte 1B1 y 6D12 no reconocían a p34-r (D.O. $\leq 0,150$). Se realizó además el proteinograma electroforético de los líquidos ascíticos, y sólo en 1A6 se observó una clara banda monoclonal. Cuando se realizó la prueba de ELISA frente a la bacteria entera, se observó que todos los MoAbs mostraban señales positivas si se utilizaba MAP que se había crecido en medio 7H9-Middlebrook con OADC, pero que A4C9, 1B1, 6B3 y 6D12, no reconocían a la misma cepa de MAP si se había crecido en medio Herrold. Al comparar la composición de los medios de cultivo utilizados, ambos recomendados por la OIE para el cultivo, encontramos que una de las diferencias entre ambos es la

presencia de seroalbúmina bovina (BSA). En una prueba de ELISA se observó que todos los MoAbs mostraban una señal de gran intensidad (D.O. ≥ 1.500) anti-BSA, que ha estado interfiriendo en la correcta evaluación de los hibridomas, a excepción de 1A6. Estimamos que hay dos momentos en la producción de los MoAbs en los que pudo haberse generado la contaminación. En el procedimiento descrito por Köhler y Milstein para la obtención de hibridomas estables se requiere sensibilizar a un ratón con el antígeno contra el cual se quiere generar el monoclonal: en nuestro caso, se utilizó p34-r y se realizó una única dosis final de MAP entera inactivada. La BSA podría asociarse de alguna forma a la membrana de MAP, aunque esto no está descrito en la bibliografía. Una vez obtenidos los hibridomas productores, las células se pueden continuar creciendo en medio de cultivo, o bien se las puede inyectar en un ratón a fin de obtener líquido ascítico. En la cavidad peritoneal del ratón, los hibridomas se reproducen y secretan grandes cantidades de MoAbs: este es un paso crítico en el cual el incorrecto lavado de las células, pudo haber llevado a pequeñas contaminaciones, ya que los hibridomas se crecen en medio RPMI1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino. De acuerdo al momento en el que se produjo la contaminación, entonces, podrían tratarse de MoAbs anti-BSA o de anticuerpos séricos anti-BSA que hayan trasudado hacia el líquido ascítico de los ratones inoculados. Actualmente continuamos los estudios mediante pruebas de ELISA e inmunoblot a fin de confirmar cuál es la situación a la que nos enfrentamos. En una inoculación experimental de ratones con BSA se obtuvieron títulos por ELISA >16.000 , lo que demuestra la gran capacidad inmunogénica de esta proteína. Hasta el momento podemos decir que una mínima contaminación con BSA puede causar grandes interferencias en la generación, selección y evaluación de los hibridomas anti-MAP.

9A. PCR_{BIO}-MAGNETO ELISA PARA LA DETECCIÓN DEL *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Nisola M.G.¹; Colombero M.²; Soutullo A.R.²; Canal A.M.³; Fabiano S.N.¹; Hernández S.R.^{1*}

¹ Laboratorio de Sensores y Biosensores (LSB) FBCB. UNL.

² Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de la Producción. Santa Fe.

³ Laboratorio de Anatomopatología FCV. UNL.

*shernand@fcb.unl.edu.ar

La tuberculosis bovina ocasionada por el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), representa una de las zoonosis de relevancia en regiones ganaderas, ya que se transmite a trabajadores rurales, a grupos etarios extremos, y a personas inmunodeprimidas. Disponer de herramientas analíticas para la detección precoz de esta micobacteria, no solo evitaría pérdidas económicas agropecuarias, sino que también contribuiría a la Salud Pública. Por tal motivo se desarrolló la detección de la secuencia de inserción IS6110 presente en el *M. bovis* (incluido en el Complejo *M. tuberculosis*) por un Magneto ELISA acoplado a una PCR_{BIO}, para lograr una metodología diagnóstica "PCR_{BIO}-Magneto ELISA" aplicada a muestras de leche. El procedimiento se basó en la recolección e inactivación de muestras de leche de tanques (200 - 400 mL), con la subsiguiente extracción y purificación del ADN con mezclas de solventes. Corroborada su pureza y concentración por lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, se realizó la resuspensión del ADN en 50 µl de agua libre de RNAsa. El "PCR_{BIO}-Magneto ELISA" (a diferencia de la PCR CONVENCIONAL) utiliza dos cebadores estratégicamente marcados. Así, los amplicones obtenidos son marcados en sus extremos opuestos, con biotina (B) y con digoxigenina (DIG). La PCR_{BIO} se realizó con 50 µl, conteniendo 2 µl de la solución del ADN purificado, los dNTPS (1 mM), el Cl₂Mg (0.2 mM), la enzima Taq (0.025 U mL⁻¹) y el par de cebadores (3 µg mL⁻¹) con un total de 25 ciclos. Luego de la PCR_{BIO}, 100 µl de la solución de amplicones (D=1/200) se pusieron en contacto bajo agitación con partículas paramagnética (PPM) modificadas superficialmente con estreptavidina durante 15 minutos, donde los amplicones quedan retenidos por efecto de la B.

Luego de un ciclo de "lavado – re suspensión – lavado" con la ayuda de un imán, las PPM son recuperadas y a través del extremo DIG son reconocidas por un anti-digoxigenina (0.075 U mL⁻¹) marcado con la enzima Peroxidasa (HRP). Posteriormente, se adicionan los sustratos y a los 5 minutos se genera una respuesta óptica (λ 450 nm), proporcional a los amplicones del *M. bovis* en la muestra. Este procedimiento, se aplicó tanto a muestras de leche de tambo de la cuenca lechera santafesina, como a controles positivos (CP) y negativos (CN) para la optimización de todos los parámetros. El CP corresponde a productos de PCR cuyo ADN molde amplificado proviene de *M. bovis* desde un cultivo microbiano y el CN corresponde a productos obtenidos de un ensayo de PCR al cual no se ha adicionado ningún ADN molde. Para la clasificación de las muestras se calculó para cada una de ellas un Porcentaje de Positividad porcentual (PP%), relacionando las respuestas de las lecturas de absorbancia del control positivo y negativo con las de la muestra; y considerando como un valor del 100% al obtenido con el control positivo. El límite de detección alcanzado fue de 2 picogramos de ADN por ensayo, 50 veces inferior al alcanzado con la PCR CONVENCIONAL. Hasta el momento se analizaron cuatro muestras de leche de un primer lote de muestreo; pudiéndose clasificar y diferenciar entre positivas y negativas. Estos resultados son alentadores, ya que el método es potencialmente transferible a mediano plazo, a dispositivos en flujo y/o microfluídicos, útiles para monitoreo en campo y para generar otras estrategias de detección de patógenos.

10A. EVALUACIÓN DE LA CONSERVACIÓN DE PLACAS DE ELISA TAPIZADAS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SAG1 PARA DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSIS

Novoa M.B.^{1,2}; Aguirre N.P.¹; Sarli M.^{1,2}; Echaide I.E.¹; Signorini M.L.^{1,2}; Primo M.E.^{1,2}

¹ EEA Rafaela, INTA;

² CONICET.

*novoa.maria@inta.gob.ar

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum*, un protozooario intracelular obligado. Provoca abortos en vacas y lesiones neurológicas en terneros. La prueba de referencia para el diagnóstico es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Dado que es una técnica subjetiva y laboriosa, se desarrollaron ensayos de inmunoenzimología (ELISA), objetivos y automatizables, utilizando lisados de taquizoitos. En el Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria del INTA Rafaela, se desarrolló un ELISA de competición (ELISAc) basado en la proteína recombinante SAG1 y el anticuerpo monoclonal (AcM) P1C2D8F8 (ELISAc_{SAG1}). El objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes tratamientos para la conservación de las placas de ELISA tapizadas con la proteína recombinante SAG1. Se tapizaron 26 placas de ELISA con 1 µg de SAG1 por pocillo, diluido en PBS hasta una concentración de 0,02 µg/µl, y se incubaron a 4°C durante 16 h. Luego las placas se dividieron en 4 grupos: GA (n= 10) se lavaron 2 veces con PBS; GB (n= 10) se bloquearon con PBS con 10% de leche descremada (PBS-L) y se lavaron con PBS con 0,05% de tween 20 (PBS-T); GC (n= 4) se bloquearon con PBS-L, se lavaron con PBS-T y se incubaron con 100 µl de un líquido sellador de placas de ELISA (Candor, Alemania); y GD (n= 2) o grupo control fueron utilizadas en el día. Todas las incubaciones se realizaron a 25°C durante 40 min. Luego, las placas de los GA, GB y GC se envasaron al vacío y se almacenaron a 4°C durante un año. Cumplido el tiempo de almacenamiento, las placas del GA se bloquearon con PBS-L, se lavaron PBS-T y luego se procesaron en paralelo con las placas de los GB y GC. Los sueros y controles se analizaron por duplicado diluidos 1:2 en PBS-L-T. En cada

placa se utilizaron 4 controles: i) suero positivo fuerte, ii) suero positivo débil, iii) suero negativo y iv) sin suero (control de conjugado, Cc); y se analizaron 44 sueros de bovinos previamente clasificados por IFI (22 sueros negativos y 22 positivos). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición (%I) según la fórmula: $\%I = 100 - [(DO_{muestra} / DO_{Cc}) \times 100]$. El punto de corte del ELISAc_{SAG1}, establecido previamente, fue ≥ 29 %I. Se compararon los %I de las muestras analizadas en las placas de los grupos GA, GB y GC con los del GD utilizando el *test* de Wilcoxon para datos pareados. Los resultados clasificados como positivos o negativos se compararon utilizando el *test* de McNemar. Los %I de los sueros analizados en las placas del GA y GB fueron significativamente diferentes a los %I obtenidos cuando los mismos sueros fueron analizados en las placas del GD (P= 0,006 y P< 0,001, respectivamente). La diferencia también fue significativa cuando se compararon los resultados positivos o negativos según el punto de corte (P< 0,001). En las placas del GA se afectó la sensibilidad (9 resultados falsos negativos) y en las placas del GB disminuyó la especificidad (2 resultados falsos positivos). En cambio, no hubo diferencia significativa entre los %I de los sueros analizados en las placas del GC y GD (P= 0,673) y la concordancia en los resultados fue del 100 % (P= 1). Los resultados obtenidos demuestran que la estrategia de conservación de las placas del GC: tapizado, bloqueo, sellado y envasado al vacío a 4°C constituye una opción de conservación adecuada de las placas para su producción y posterior distribución en formato de *kits* de diagnóstico. La posibilidad de almacenar placas de ELISA, permitirá transferir la técnica a otros laboratorios.

SESIÓN II: DIAGNÓSTICO E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

1B. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE OSTEOPONTINA Y LA DE CITOQUINAS DURANTE LA PLACENTACIÓN PORCINA

Vélez C.^{1,3*}; Williamson D.¹; Lopez N.¹; Clazure M.^{1,3}; Koncurat M.¹; Barbeito C.^{2,3}

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina;

² Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

³ CONICET.

*cvelez@vet.unlpam.edu.ar

La gestación en mamíferos se establece gracias a una comunicación entre el endometrio y el trofoblasto en la que participan las moléculas de adhesión y el sistema inmunológico, con el fin de lograr la aceptación del *conceptus*, la adhesión de los epitelios materno y fetal y permitir una preñez exitosa. La osteopontina (OPN) es una glicoproteína implicada en varios procesos, incluyendo adhesión y migración celular. También se ha demostrado que en relación con el sistema inmune, la OPN es sintetizada ante la presencia de TNF- α , IL-1b e IL-2, co-estimulando la proliferación de células, clasificándose como una citoquina Th1 por su capacidad para aumentar la producción de INF- γ e IL-2. Además se ha demostrado que la OPN es un factor anti-apoptótico. Durante la gestación porcina hay etapas que, a nivel tisular, predomina un ambiente proinflamatorio: 17, 30 y 60-70 días de gestación (dg), periodos de cambios estructurales que permiten la implantación y remodelación placentaria. En este trabajo se analizó la expresión de la OPN en la interfase feto-materna, y su relación con los niveles placentarios de interleuquinas pro y anti-inflamatorias, durante la gestación porcina. Se recolectaron úteros de cerdas no gestantes (n=5) y placentas (n=25) de 17, 30, 60, 70 y 114 dg. La expresión de OPN se analizó mediante inmunoperoxidasa. Se determinó la densidad óptica (DO) de la inmunotinción utilizando ImageJ. La determinación de las citoquinas se realizó por ELISA. A los 17 dg, la OPN se halló elevada en el trofoblasto, y se expresó levemente en el epitelio luminal endometrial. A los 30 y 60 dg su DO aumentó tanto en los epitelios maternos como fetales, disminuyendo significativamente desde los 70 dg. En la interfase placentaria, el INF- γ presentó un pico de concentración a los 17 dg, con predominio en la placenta fetal, disminuyendo significativamente hacia los 114 dg. Asimismo, las IL-1 β , IL-2 e IL-4 se elevaron a los 30 dg en

la interfase placentaria. Estas moléculas se elevaron en el tejido a los 60 y 70 dg y disminuyeron significativamente a término. Los resultados sugieren que la baja DO de OPN a los 17 dg en epitelio materno comparada con la elevada expresión en el trofoblasto, nos indica que sería sintetizada *de novo* por el trofoblasto. También observamos que la presencia elevada tanto de OPN como de INF- γ en la interfase feto-materna a los 17 dg permitiría el diálogo molecular entre el endometrio y el trofoblasto para una correcta implantación. Este ambiente proinflamatorio estaría regulado por la presencia elevada en placenta materna de IL-4. La IL-1 β a los 30 dg estaría presente en la interfase placentaria porcina por su comportamiento proinflamatorio, y además participaría como regulador de las moléculas de adhesión. A los 30 dg se observa la mayor DO de OPN en los epitelios de la interfase feto-materna; sugiriendo que sería fundamental para el sostenimiento de la estructura placentaria y las citoquinas regularían su expresión. Observamos que IL-1 β , IL-2 e IL-4 se hallan presentes en la placenta fetal a los 30, 60 y 70 dg. En estas etapas se producen profundos cambios estructurales placentarios; por ello postulamos que estas citoquinas serían necesarias para favorecer los mecanismos moleculares y celulares que permiten la remodelación placentaria. La OPN presente en la interfase, estaría participando en la regulación de la secreción de IL-2 en su rol de citoquina Th1. La disminución de OPN a los 70 dg, etapa de mayor remodelaje placentario, se debería a que actuaría como supresor de la apoptosis. La fuerte presencia de IL-2 en placenta fetal a los 70 dg, regularía negativamente a OPN, ya que predomina un ambiente pro-apoptótico. Por último la IL-4, potente citoquina anti-apoptótica, regularía tales efectos citotóxicos a fin de preservar el aloinjerto fetal.

2B. DESARROLLO DE PRUEBA DE INMUNOAGLUTINACIÓN DIRECTA PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE PARATUBERCULOSIS BOVINA

Alonso N.¹; García V.²; Moyano R.D.¹; Romero M.³; Gugliotta L.M.²; González V.²; Romano M.I.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) CONICET, Santa Fe, Argentina.

³ Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad de La Plata, Argentina.

*alonso.natalia@inta.gob.ar

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne es una enfermedad altamente contagiosa, cuya forma más común de infección es por contacto con materia fecal contaminada. El microorganismo ingresa por vía oral y causa enteritis granulomatosa crónica principalmente en bovinos, aunque la enfermedad se ha descrito en otros huéspedes como cabras, ovejas, ciervos, bisontes y recientemente camélidos. El agente etiológico es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). La enfermedad presenta un período de incubación prolongado que oscila entre 2 y 8 años, iniciándose con estadios subclínicos que pueden durar varios años, hasta la presentación de signos clínicos y la eliminación de micobacterias en la materia fecal. En Argentina la seroprevalencia de PTB es de 4 a 51% dependiendo de la región. Las pérdidas por PTB se relacionan con muerte, eliminación temprana de animales, reducción de la producción de leche, carne y rendimientos reproductivos, aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas, entre otros. El diagnóstico de certeza de PTB en el animal vivo es el aislamiento de *Map*, de materia fecal, pero este es un microorganismo de crecimiento muy lento necesitando mínimo dos meses para identificar colonias en cultivo y dependiente de micobactina para su crecimiento *in vitro*. La presencia de ADN de *Map* puede detectarse por diversas técnicas moleculares como PCR convencional o en tiempo real. También se utilizan técnicas diagnósticas que detectan la respuesta inmune del hospedador. En la etapa inicial de la enfermedad, la

respuesta inmune es de tipo celular, siendo factible su determinación con el uso de la prueba intradérmica con derivado proteico purificado (PPD) aviar, la prueba de linfoproliferación y la cuantificación de gamma interferón. Posteriormente, con el avance de la enfermedad, predomina la respuesta inmune de tipo humoral, obteniéndose un diagnóstico serológico indirecto, principalmente ELISA. El objetivo del presente trabajo es desarrollar un test de inmunoaglutinación directa para la detección rápida de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en sueros bovinos que pueda ser utilizado al pie del animal. Para llevar a cabo este objetivo, nanopartículas de látex carboxiladas fueron sensibilizadas con diferentes concentraciones del antígeno comercial PPA-3 (proteínas protoplasmáticas del complejo *M. avium*) con el fin de determinar las condiciones óptimas de la técnica. Los complejos obtenidos (PPA-3-nanopartículas de látex) fueron evaluados en un ensayo de inmunoaglutinación directa con los siguientes sueros bovinos de identidad conocida: 25 sueros bovinos correspondientes a animales con PTB positivo confirmado por cultivo y PCR, y 32 sueros bovinos proveniente a animales libres de PTB. La especificidad y sensibilidad de la técnica fue de 87.5% y 76% respectivamente. En el presente trabajo hemos desarrollado una técnica de detección de PTB en sueros bovinos que permite la identificación rápida y específica de animales infectados con MAP.

3B. ENFERMEDAD RESPIRATORIA BOVINA: ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO Y DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Demarco R.^{1*}; Quiroga M.A.¹; Fazzio L.E.²; Abraham G.¹; Gilead T.¹; Negrelli Pilar M.¹; Rearte R.³; Streitenberger N.¹

¹ Laboratorio de Patología Especial Veterinaria "Dr. Bernardo Epstein".

² Cátedra de Medicina Bovina.

³ Cátedra de Epidemiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*renzo11demarco@hotmail.com

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es una afección muy frecuente en ganado bovino, y el virus sincicial respiratorio bovino (BRSV) es un importante contribuyente en la patogénesis. Los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar la frecuencia de los patrones de lesión pulmonar en casos de ERB, estandarizar la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para detección de BRSV en tejido pulmonar y determinar la prevalencia de este virus en los casos en estudio. Se seleccionaron casos de bovinos con lesiones pulmonares compatibles con ERB ingresados al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, FCV-UNLP en el período 2005-2017 (n=89). Las muestras se fijaron en solución de formaldehído neutro 10% y se procesaron según las técnicas histológicas de rutina. Microscópicamente, las lesiones se clasificaron según lo propuesto por Murray y col., 2017. Para la detección de BRSV mediante IHQ se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa convencional que se estandarizó siguiendo las recomendaciones de Ramos Vara y col., 2008. Se utilizaron como controles un set de tejidos de pulmón positivo y negativo para BRSV por IHQ y PCR provistos por el Dr. Francisco Uzal (UCDavis). Como anticuerpo primario se aplicó el anticuerpo policlonal anti-RSV (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) en dilución 1:1000, durante la noche, a 4°C. Además, cada tejido testeado se incubó con un diluyente comercial (controles negativo de reactivo) (Da Vinci Green Diluent, Biocare Medical, USA). Se realizó recuperación antigénica utilizando tripsina 0,1% (Sigma). Para el bloqueo de uniones inespecíficas, se utilizaron leche descremada 0,05%, albúmina sérica bovina 1% y suero equino normal 2,5% (Vector, USA). Como sistema de detección, se utilizó un kit de polímero-peroxidasa (ImmPRESS REAGENT, Vector, USA). Finalmente, los cortes se contracoloraron con hematoxilina. Los datos de cada animal se recolectaron de los protocolos de necropsia y la distribución de las muertes, según edad, se estimó con el método de Kaplan-Meier (SAS académico). Los patrones anatomopatológicos de lesión

pulmonar fueron: bronconeumonía fibrinosupurativa (61%), neumonía intersticial (21%), neumonía broncointersticial (11%) y bronquitis-bronquiolitis (7%). En un 12% (11/89) de los casos se identificaron sincitios en el epitelio bronquiolar y uno de estos casos presentó además cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en las células epiteliales bronquiales. Se observaron leucocitos necróticos (patrón "grano de avena") en un 38% (34/89) y vasculitis y/o trombosis en un 31% (28/89) de los casos, lesiones características de infección por bacterias de la familia *Pasteurellaceae*. Además, dos individuos evidenciaron focos de necrosis caseosa sugestivos de infección por *Mycoplasma bovis*. La distribución de las muertes asociadas a ERB reveló que el 84% de las mismas se produjeron en los primeros 20 meses de vida. En los pulmones evaluados, el porcentaje de detección de BRSV por IHQ fue del 3% (3/89), resultado menor a estudios de otras partes del mundo que utilizaron técnicas moleculares (9-10%). Esto podría deberse en parte, a que la infección por el virus es transitoria y de corta duración, siendo el virus detectable en los tejidos sólo hasta 8 días post infección. Por otro lado, la sensibilidad de la IHQ respecto a las técnicas moleculares pudo haber contribuido a la menor detección. No obstante, los hallazgos demuestran que el BRSV participó en el desarrollo de las lesiones de ERB. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte en nuestro país de detección de BRSV en tejido pulmonar mediante IHQ siendo también la primera descripción de la estandarización de la técnica utilizando el anticuerpo policlonal anti-RSV de origen comercial mencionado. La evaluación de las lesiones pulmonares junto con la detección del virus por IHQ fueron, en este contexto, herramientas de gran utilidad en el diagnóstico y monitoreo del BRSV en bovinos.

Trabajo realizado en el marco del Programa de Incentivos a Docentes Investigadores, 11/V257, U.N.L.P.

4B. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS PARA *NEOSPORA CANINUM* Y *TOXOPLASMA GONDII* POR LA TÉCNICA DE IMMUNOBLOT EN CIERVOS COLORADOS (*CERVUS ELAPHUS*)

Dellarupe A.^{1,2}; Moré G.^{1,2}; Campero L.M.^{1,2}; Pardini L.^{1,2}; Soler J.P.³; Unzaga J.M.¹; Venturini M.C.¹

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología, (LAINPA), FCV, UNLP.

² CONICET.

³ Actividad privada.

*adellarupe@gmail.com

Las infecciones producidas por protozoos de vida intracelular obligada como *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* afectan a una amplia variedad de animales en todo el mundo. Se ha evidenciado que los ciervos pueden estar infectados con ambos protozoos. La neosporosis y toxoplasmosis se asocian principalmente con la aparición de abortos en bovinos y pequeños rumiantes. Una de las pruebas diagnósticas indirectas más utilizadas para evidenciar infecciones con estos protozoos es la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), sin embargo, no se han llevado adelante comparaciones ni confirmaciones por técnicas con mayor especificidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de anticuerpos para *T. gondii* y *N. caninum* por la técnica de Immunoblot (IB) y comparar con los resultados obtenidos por IFI, en sueros provenientes de ciervos colorados de la provincia de Buenos Aires. Se analizaron sueros de 4 ciervos colorados hembras de la provincia de Buenos Aires, recolectados en dos momentos distintos (n=8) (intervalo trimestral) y analizados previamente por la técnica de IFI. Las muestras fueron procesadas por la técnica de IB utilizando como antígeno taquizoítos sonicados de la cepa de referencia RH de *T. gondii* y NC-1 de *N. caninum* separadamente. Los sueros fueron utilizados en la dilución 1/100 y se utilizó como conjugado anticuerpos anti-IgG bovina unido a peroxidasa 1/1000 (Jackson ImmunoResearch). Se utilizaron, como controles, sueros de bovinos infectados (controles positivos)

y no infectados (controles negativos) por estos parásitos. Tres de los 4 animales habían presentado títulos de IFI altos (≥ 800) tanto para *T. gondii* como *N. caninum* en ambos muestreos, y el restante fue solo positivo a *N. caninum* en el segundo muestreo. De los 3 animales seropositivos a ambos protozoos por IFI, 2 presentaron reacción a los antígenos inmunodominantes (IDAs) de *N. caninum* y *T. gondii* mediante IB en ambos muestreos, mientras que 1 animal demostró reacción a los IDAs sólo de *N. caninum* también en ambos muestreos. Por otro lado la cierva que había presentado anticuerpos anti *N. caninum* en el segundo muestreo por IFI, resultó negativo tanto para *T. gondii* como para *N. caninum* por la técnica de IB. Este es hasta nuestro conocimiento, el primer estudio en el que se utiliza la técnica de IB para *N. caninum* y *T. gondii* en ciervos colorados. Se confirmó la reacción a los IDAs de estos protozoos en muestras de ciervos, lo que confirmaría la especificidad de los resultados de IFI. Sin embargo, algunas muestras positivas por IFI resultaron negativas por IB, quizás debido a una menor sensibilidad analítica usando conjugados heterólogos. Estos resultados demuestran la factibilidad del uso de esta técnica en ciervos, aunque se requiere el procesamiento de un mayor número de muestras para su validación. Por otro lado, futuros estudios serán llevados a cabo para relacionar la asociación entre la presencia de abortos y la positividad para algunos de estos agentes.

5B. AVANCES PRELIMINARES EN EL ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS PHOP Y ESAT-6/CFP-10/RV3615C, Y SU APLICACIÓN DIAGNÓSTICA EN EL MARCO DE UN ENSAYO DE VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA

Ferrara Muñiz X.¹; Garbaccio S.²; García E.¹; Blanco F.¹; Bigi F.¹; Vodermeier M.³; Abdala A.⁴; Cataldi A.¹; Eirin M.E.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO, CONICET-INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. ² Instituto de Patobiología Veterinaria (IPV, CONICET-INTA), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

³ Animal and Plant Health Agency (APHA) / Aberystwyth University, UK. 4INTA, EEA. Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina.

*eirin.maria@inta.gov.ar

Actualmente no hay vacunas que eviten la transmisión de *M. bovis* en bovinos. Existen estudios avanzados en Nueva Zelanda y el Reino Unido. El candidato *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* (3), tiene los genes codificantes de los antígenos ESAT6, CFP10 y Mb3615c. PhoP regula la secreción de ESAT6/CFP10. La cepa *M. bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* está deletada en el gen *phoP*. Esto disminuye la secreción de ESAT6, en comparación con una cepa salvaje. Nuestro objetivo fue caracterizar la potencialidad diagnóstica de las proteínas ESAT6/CFP10/Rv3615c y PhoP en un ensayo de vacunas con cepas atenuadas de *M. bovis*. A tal efecto se vacunaron, por vía subcutánea (1.10^7 UFC), 4 grupos de 15 bovinos cada uno, negativos para tuberculosis bovina (TBB), con las cepas: *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP*, *M.bovis* Δ *mce2*, BCG y un grupo sin vacunar (NV). A los 4 meses se revacunó. La proteína de fusión recombinante ESAT6/CFP10/Rv3615c y el vector pet15-Phop se expresaron en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad. Se estimuló sangre heparinizada con 5ug/ml de ESAT6/CFP10/Rv3615c y PhoP, PPDA y PPDB (300UI/ml) (antígenos patrón), PBS1X y 5ug/ml de mitógeno (Sigma). Se determinó la reactividad por liberación de IFN- γ con un kit comercial (Bovigam, Thermofisher) al inicio del ensayo (T0), 4 meses post-vacunación (t1) y 1 mes post-revacunación (t2). Se consideró reactividad positiva a cada antígeno o mitógeno cuando las diferencias entre las DO obtenidas con antígeno y con PBS1X, fuesen mayor o igual a 0.1. En el muestreo t0, todos fueron negativos para las proteínas recombinantes. En el muestreo t1 según el kit comercial hubo 1 positivo en el grupo *M.bovis* Δ *mce2*.

No hubo positivos para las proteínas recombinantes. En el muestreo t2, el kit comercial detectó sensibilización con antígenos patrón en *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* (10/15; 67%); *M.bovis* Δ *mce2* (14/15; 94%), BCG (4/12; 33%), NV (2/13; 15%). Con PhoP hubo positivos en *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* (1/15; 6%); *M.bovis* Δ *mce2* (2/15; 13%), BCG (1/12; 6.7%). Con la ESAT6/CFP10/Rv3615c hubo positivos en *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* (2/15; 13%), *M.bovis* Δ *mce2* (6/15; 40%), BCG (1/12; 8%) y NV (2/13; 15%). Este estudio, aunque preliminar, evidenció un patrón de reactividad mayor en *M.bovis* Δ *mce2*, seguido por *M.bovis* Δ *mce2* Δ *phoP* y luego por BCG para todos los antígenos. PPDB detectó un mayor número de animales, quizás por su naturaleza compleja (constituida por cientos de proteínas). Con PPDB y ESAT6/CFP10/3615c hubo positivos en el grupo NV, pero no con PhoP, lo cual podría explicarse por excreción de alguna cepa vacunal, ya que los grupos coexisten luego de la revacunación. Pho reaccionó positivamente en un animal vacunado con la cepa deletada en el gen *phoP*, lo que podría explicarse por sensibilización inespecífica con PhoP de otras bacterias, el cual está presente incluso en géneros diferentes a *Mycobacterium*, o por sensibilización con otra cepa vacunal que tenga el gen *phoP*. La concreción del ensayo y evaluación de los antígenos en animales infectados y negativos a campo, permitirán comprender el real aporte de estas proteínas al diagnóstico asociado a la vacunación con las cepas evaluadas.

6B. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *BRUCELLA ABORTUS* EN PERROS DE ZONA RURAL. EMPLEO DE LA TÉCNICA DE FLUORESCENCIA POLARIZADA

Pérez Meyer L.¹; Miceli G.S.²; Peralta L.M.³; Mórtola, E.^{2*}

¹ Profesional independiente, Coronel Suárez;

² Inmunología Veterinaria Aplicada;

³ Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) de Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

*mortola@fcv.unlp.edu.ar

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa zoonótica de curso crónico y de distribución mundial. Las bacterias del género *Brucella* incluyen cepas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* entre otras) y cepas rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). Esta enfermedad es particularmente contagiosa, pudiendo ocurrir la transmisión cruzada de especies de *Brucella* entre individuos. En los perros suele ser causada por *B. canis*; sin embargo, la *B. abortus*, asociada con el bovino infectado, se ha descrito en perros tanto en forma experimental como en condiciones de campo y también es posible la transmisión de perros a humanos. En esta comunicación, se describe por primera vez en Argentina, la detección de anticuerpos anti-*B. abortus* en una población de perros en contacto con una zona rural y se incorporó a la fluorescencia polarizada (FPA) como prueba diagnóstica en caninos. Se analizaron 67 muestras de sangre de caninos. La muestra estaba compuesta por 35 animales que habitaban en zona rural, 29 animales que habitaban en zona urbana pero que concurrían asiduamente al campo transportados por sus dueños y 3 animales que habitaban en zona urbana pero convivían con perros que concurrían al campo. Para detectar anticuerpos anti-*B. abortus* se realizó, en primer término, la prueba de antígeno tamponado en placa (BPA). Las muestras positivas a BPA se le realizaron las pruebas confirmatorias de seroaglutinación lenta en tubo (SAT), prueba de 2- mercaptoetanol (2-Me) y prueba de FPA. Para detectar anticuerpos anti-*B. canis* se efectuó la prueba de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT). De las muestras analizadas fueron positivas a BPA 26,8%. Utilizando los criterios de interpretación para

bovinos, solo los perros positivos a BPA fueron analizados por las pruebas confirmatorias y obtuvimos los siguientes resultados: 7,5% fueron positivos a SAT y 2-ME con un título de anticuerpos $\geq 1:100$, y 4,5% resultaron positivos a FPA con valores >105 unidades de milipolarización. Del total, solo 2 de los animales resultaron positivos a RSAT para *B. canis* y uno de ellos resultó también positivo a BPA. Tal como ocurre en bovinos, es factible que la presencia de falsos positivos a BPA puede deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas que comparten un lipopolisacárido superficial similar al que presenta *Brucella*. Los perros reaccionantes a *B. abortus* tuvieron contacto con bovinos seropositivos a brucelosis y podían tener acceso a fetos abortados y placentas, o eran perros de zona urbana que convivían con perros que habían concurrido a la zona rural. En perros infectados con *B. abortus*, la excreción de agentes a través de la orina o heces podría explicar la infección de los perros de zona urbana que no fueron al campo, pero tuvieron contacto con perros que si lo hicieron. En referencia el serodiagnóstico en caninos de cepas lisas de *Brucella*, no se ha diseñado ni estandarizado hasta el momento ninguna prueba, empleándose los mismos que en bovinos. Si bien no existen antecedentes sobre el uso de FPA en perros, los datos de este trabajo, podrían constituir, en un futuro, una herramienta útil de diagnóstico, si se establece el punto de corte y la concordancia con las pruebas clásicas de SAT y 2-Me. Durante los programas de erradicación de brucelosis, las pruebas serológicas de perros para *B. abortus* pueden ser un indicador valioso (centinela) de la presencia de la enfermedad en el ganado bovino.

7B. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE INMUNOCRITO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN EL CALOSTRO PORCINO

Miceli G.S.¹; Larsen A.¹; Barragán J.²; Mortola E.¹

¹ Inmunología Veterinaria Aplicada y Laboratorio de Inmunología Veterinaria;

² Inmunología 2da. Parte, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*mortola@fcv.unlp.edu.ar

La función principal del calostro porcino, además de proporcionar nutrición al neonato, es la transferencia pasiva de la inmunidad. Debido a la placentación epiteliocorial, los lechones nacen hipo o agamaglobulinémicos, y las inmunoglobulinas (Igs) se transfieren de la madre a través del calostro dentro de las primeras 18-24 h de vida. Una ingesta suficiente de calostro de buena calidad inmunológica y niveles altos de Igs (predominantemente IgG) en el suero, es esencial para la sobrevivencia del lechón. La calidad inmune del calostro varía entre cerdas, donde la raza, edad, genética, número de partos, programa de inmunizaciones, composición del alimento y manejo productivo, influyen en el rendimiento y la composición del calostro. Por lo expuesto, resulta importante contar con un método rápido, simple y efectivo para medir la concentración de Igs del calostro. En el presente trabajo, hemos adaptado el método del inmunocrito (Ic) para medir la concentración de Igs en el calostro porcino. El Ic se ha desarrollado como un método simple para evaluar la concentración de Igs en suero sanguíneo de lechones, terneros y potrillos pero se desconocía si este ensayo podría tener una utilidad similar para el calostro. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del Ic para medir la concentración de Igs del calostro y compararlo con un método de referencia como la electroforesis y densitometría. Se recolectaron al momento del parto, 50 muestras de calostro de cerdas de diferentes pariciones y se mantuvieron congeladas hasta su procesamiento. Debido a las características de la muestra, relacionada con la densidad del calostro, fue necesario previamente la obtención de suero calostroal. Con este objetivo se realizó una primera centrifugación para eliminar la grasa; posteriormente se le agregó CaCl₂ y

cuajo o renina y se incubó a 35°C por 30 min. Una segunda centrifugación fue suficiente para obtener un suero calostroal lo convenientemente fluido y adecuado para realizar las pruebas. Para el método del Ic, se mezclaron volúmenes iguales (100 µl) de cada una de las muestras de suero calostroal y una solución de (NH₄)₂SO₄ al 40% y se cargaron los tubos capilares no heparinizados de 75 mm. Los tubos se centrifugaron a 12,700 X g durante 5 min en una centrífuga de microhematocrito. Los tubos capilares se retiraron de la centrífuga y los valores del Ic se leyeron con la tarjeta lectora de microhematocritos. Los valores obtenidos por este método se contrastaron con los valores de Igs de los sueros calostrales obtenidos de la electroforesis y densitometría. El análisis estadístico entre ambos procedimientos, mostró una alta correlación (r = 0,89). Sin embargo, la correlación entre la concentración Igs y proteínas totales de las muestras de calostro fue baja (r= 0,62). Los resultados hallados demostraron que la obtención del suero calostroal es fundamental para evitar el taponamiento del tubo de hematocrito y que el Ic proporciona un método útil para cuantificar las Igs del calostro. La medición de las proteínas totales en las muestras de calostro no sería una buena estimación de la concentración de Igs. Las principales ventajas del método aquí propuesto, incluyen un equipo y entrenamiento mínimos con suministros muy económicos y fáciles de adquirir y poco volumen de muestra. Esta técnica podría ser de utilidad en trabajos experimentales que involucren la medición de la Igs de calostro para relacionarlo con parámetros de aptitud materna, sobrevivencia de lechones, manejos al parto, etc.

8B. ESTUDIO PRELIMINAR DE EFECTOS LOCALES PRODUCIDOS POR SERPIENTES JUVENILES DEL GÉNERO *BOTHRUPS*

Díaz D.^{1*}; Nuñez S.¹; Sánchez M.²; Mussart N.³; Picot J.⁴; Teibler P.²; Maruñak S.²

¹ Cátedra de Inmunología.

² Laboratorio de Toxicología.

³ Hospital de Clínicas.

⁴ Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE. Sargento Cabral 2139 - Corrientes.

*darieldiaz0094@gmail.com

Los accidentes ofídicos más comunes en Latinoamérica son los producidos por mordeduras de serpientes del género *Bothrops*. Las serpientes de mayor importancia y distribución en Argentina son las pertenecientes a la especie *Bothrops alternatus* (yará grande) y *Bothrops diporus* (yará chica). La inflamación es un mecanismo de defensa caracterizado por incremento en la permeabilidad vascular, edema, y migración de leucocitos desde la vasculatura al daño tisular para destruir el agente nocivo. Las Fosfolipasas PLA₂s son enzimas responsables de inducir la producción de edema y promueven el infiltrado de células inflamatorias. El efecto hemorrágico es causado por un grupo de toxinas, las cuales pertenecen al grupo de enzimas proteolíticas del tipo metaloproteinasas. Estas enzimas afectan la integridad de los capilares sanguíneos induciendo al sangrado local y sistémico. El propósito del presente estudio fue evaluar la actividad edematizante y hemorrágica de dos venenos de especímenes juveniles de *B. diporus* y *B. alternatus* en ratones, a través de diferentes métodos para dichas determinaciones. Para valorar cada una de las actividades, se inocularon 20 ratones de 18-20 g de peso vivo (cepa CF1), conformando 5 grupos de 4 animales por dosis, con concentraciones crecientes de veneno (0,5 µg, 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg). Para determinar la actividad edematizante se inyectaron a los animales, diferentes dosis de veneno, por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha (50 µl), la almohadilla plantar izquierda recibió el mismo volumen de

buffer fosfato, utilizada como control. El edema se determinó midiendo el espesor de ambos miembros inoculados con un calibre digital, a diferentes intervalos de tiempo (30 minutos, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h). Se calculó la diferencia de espesor y se expresó como porcentaje. En cuanto a la actividad hemorrágica se inyectaron ratones por vía intradérmica en la región abdominal. A las 2 h se procedió a retirar un fragmento circular de piel del sitio de inoculación. Se utilizó el método de Drabkin & Austin 1932, para cuantificar la hemoglobina tisular por medio de la formación de cianometahemoglobina. Con los valores de absorbancia obtenidos, se calculó la concentración de hemoglobina en g/dl, y se determinó una media para cada concentración. La actividad hemorrágica se calculó por diferencia entre el contenido de hemoglobina de las diferentes dosis. A la media hora de la inoculación observamos que ambos venenos incrementaron el porcentaje de edema, y a partir de las 3 horas *B. diporus* empezó a disminuir la inflamación, mientras que *B. alternatus* comenzó a partir de las 6 horas. En cuanto a la actividad hemorrágica se comprobó que al incrementar la concentración de veneno aumenta el halo hemorrágico, con mayor efecto hemorrágico de *B. diporus*, mientras que *B. alternatus* recién lo hace a partir de la concentración de 2,5 µg, el mismo comportamiento se demostró en ejemplares adultos, en trabajos publicados por nuestro grupo de investigación.

9B. ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MODIFICADA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LA TOXOPLASMOSIS ANIMAL

Runco M.¹; Campero L.M.^{1,2}; Gos M.L.^{1,2}; Pardini L.^{1,2}; Venturini M.C.^{1*}

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

² CONICET.

*cventuri@fcv.unlp.edu.ar

Toxoplasma gondii es un protozoo que afecta a una gran diversidad de especies animales, incluido el hombre. El diagnóstico de la enfermedad es importante para la salud pública y permite adoptar distintas medidas de control. En un estudio previo se utilizó una prueba de aglutinación comercial indicada para el diagnóstico en humanos, para la detección de anticuerpos en perros, demostrando baja sensibilidad y moderada especificidad. Esto demuestra la importancia de estandarizar y validar cualquier prueba diagnóstica previo a su uso en medicina veterinaria. La prueba de aglutinación modificada (MAT) ha sido utilizada con éxito para el diagnóstico de toxoplasmosis en especies domésticas y especialmente silvestres ya que no requiere conjugados específicos. El objetivo del trabajo fue producir antígeno para la prueba de MAT siguiendo la metodología propuesta por Dubey y Desmonts y evaluarla en nuestro medio a partir de un estándar relativo de comparación (ERC) conformado según las normas de la OIE. Para ello, se formó un panel de 24 sueros provenientes de distintas especies animales (perros y cabras) y se evaluó mediante 2 pruebas diagnósticas de referencia, la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un título de corte de 1:50 para perros y 1:100 para cabras y la prueba de *Immunoblot* (IB). Con IB un suero se consideró positivo al detectarse reacciones hacia 2 o más antígenos inmunodominantes (34, 32, 30, 28 kDa). El antígeno para MAT se elaboró infectando células VERO con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* que luego de 48-72 h de crecimiento, se recolectaron y se purificaron en columnas. Se inactivaron con formalina y se conservaron a 4°C. Los sueros fueron seleccionados respetando una

proporción 1:3 (positivo: negativo). Se realizaron diluciones seriadas en buffer de dilución (pH 7,2) desde 1:25 hasta 1:200. El antígeno se diluyó en una solución buffer alcalina (pH 8,95) adicionando 2-mercaptoetanol y azul de Evans. Se colocaron 25µl/pocillo de antígeno en una microplaca de 96 pocillos y se agregaron 25 µl de las diluciones de los sueros por pocillo. Se incubó la placa cubierta con film a 37°C *overnight* seguido de 4 horas de incubación a 4°C. La lectura se realizó mediante el uso de un espejo magnificado. Se consideró un resultado positivo la visualización de un entramado y un resultado negativo a la observación de un botón azul en fondo del pocillo. Se evaluó el desempeño de la prueba de MAT respecto al ERC. Los resultados obtenidos coincidieron en su totalidad con los resultados obtenidos por IFI e IB, sin registrar resultados falsos positivos o falsos negativos. Si bien para estandarizar la prueba, es necesario un mayor número de sueros de animales de distintas especies, estos resultados preliminares sugieren que su uso permitiría la obtención de resultados confiables en relación con la sensibilidad y especificidad. El uso de una prueba de diagnóstico tiene relación con el objetivo del estudio. Por esa razón, en el caso de realizar un seguimiento diagnóstico, sería más adecuado el uso de pruebas primarias (IFI, ELISA, IB). Sin embargo, la prueba de aglutinación modificada validada en diferentes especies, permitiría analizar muestras provenientes de animales silvestres, al no requerir de conjugados específicos de especies y eventualmente la realización de estudios epidemiológicos.

SESIÓN III: INMUNOINTERVENCIÓN Y VACUNAS

1C. PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LAS CEPAS DE LOS AÑOS 2001 Y 2018 DEL VIRUS DE INFLUENZA EQUINA EN CABALLOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS EN BUENOS AIRES, ARGENTINA

Abeyá M.M.^{1,2*}; Larsen A.E.¹; Rodríguez A.³; Ramírez P.D.³; Smith V.³; Echeverría M.G.^{1,2}; Sguazza G.H.¹

¹ Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³ Estudiantes de la Especialidad en Diagnóstico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*mercedesabeya@hotmail.com

El agente causal de la influenza equina (IE) es un virus perteneciente a la familia Orthomyxoviridae. Estos virus están constituidos por una nucleocápside proteica, dentro de la cual se halla el genoma viral formado por ocho segmentos de ARN de simple cadena y polaridad negativa. La superficie externa de estos virus se encuentra cubierta por dos glicoproteínas con forma de espículas, la hemoaglutinina y la neuraminidasa, cuyas diferencias antigénicas permiten subdividirlos en diferentes subtipos serológicamente diferenciados. La IE es una enfermedad respiratoria viral sumamente contagiosa. En los caballos el agente etiológico es el virus de influenza A, subtipos A equi 1 (H7N7) y equi 2 (H3N8). Actualmente, el subtipo circulante es H3N8, no registrándose aislamientos de H7N7 desde hace más de 30 años. Los brotes de IE suelen estar asociados a la concentración de equinos en eventos ecuestres, donde adquieren la enfermedad que luego diseminan al regresar a sus establecimientos. La medida profiláctica más importante es la aplicación de vacunas. La enfermedad puede manifestarse con fiebre y tos seca constante, seguida de secreción nasal inicialmente serosa, que luego pasa a ser mucopurulenta. En la República Argentina, en los años 2000 y 2001, se produjo un brote de IE en los hipódromos de Palermo y de San Isidro, donde se enfermaron aproximadamente el 40% de los equinos en entrenamiento. El último brote confirmado de IE en la Argentina se produjo en 2018 y afectó principalmente a los hipódromos de la provincia de Mendoza y San Juan. Si bien los títulos de IgG alcanzados mediante la vacunación son adecuados, la inmunización conseguida con el tipo de vacuna comúnmente disponible en el mercado induce una

respuesta inmune de corta duración y cuantitativamente menor a la inmunidad obtenida luego de la infección natural con el virus. Por lo tanto, los caballos que han sido infectados naturalmente permanecen protegidos de una reinfección por períodos de un año o más. Dado que se desconoce la situación inmunológica real de la población de equinos de Argentina, el objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia de anticuerpos protectores contra IE en dos subpoblaciones específicas: equinos vacunados (50 animales) y no vacunados (50 animales). Se evaluó la presencia de anticuerpos contra dos cepas del virus de la influenza equina: A/eq/La Plata 2001 y la cepa causante del brote de 2018, utilizando la técnica de la inhibición de la hemaglutinación. Los títulos obtenidos permitieron clasificar a los equinos en protegidos (título igual o mayor 1/128), parcialmente protegidos (títulos 1/16, 1/32 y 1/64) y no protegidos (título igual o menor a 1/8). En el establecimiento donde se vacunó de acuerdo al calendario sugerido por SENASA (trimestralmente) el 54% y el 38% de los equinos fueron considerados como protegidos contra las cepas del año 2001 y 2018, respectivamente. El 52% de los animales sin vacunación fueron considerados como protegidos contra la cepa 2001, mientras que solo el 22% contra la cepa del brote del 2018. Estos resultados permiten deducir que la inmunización vacunal es una medida profiláctica efectiva para obtener un título de anticuerpos protectores frente a la posibilidad de un brote, como el ocurrido en 2018. No se observaron diferencias significativas entre ambos establecimientos para la cepa 2001, posiblemente debido a que los animales, aun sin ser vacunados, fueron expuestos a la infección natural.

2C. DESARROLLO DE UNA NUEVA VACUNA ANTIAFTOSA DE VOLUMEN REDUCIDO PARA CERDOS

Scian R.¹; Guevara K.¹; Mejías P.¹; Filippi J.¹; Bellinzoni R.; Cardillo S.¹.

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

*Romina.Scian@biogenesisbago.com

En la actualidad cuando la especie porcina está considerada en los planes de vacunación contra Fiebre Aftosa, la práctica más común es la inoculación intramuscular de 2 mL de una vacuna oleosa en el área retroauricular del cuello. Las vías subcutáneas e intradérmica han sido descriptas como métodos alternativos para reducir las reacciones en el sitio de inyección y evitar decomisos en el frigorífico de músculos de alto valor. Sin embargo, las formulaciones disponibles hasta el momento no son compatibles con este tipo de procedimiento. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una vacuna de volumen reducido para cerdos que sea potente y eficaz, capaz de ser inoculada por las vías subcutánea e intradérmica, evitando la ocurrencia de lesiones en tejido muscular. Se formuló una vacuna monovalente (cepa O1 Campos) de 0,5 mL/dosis de emulsión simple oleosa. Se dispusieron de 40 cerdos de 8 semanas de edad organizados en 4 grupos (n=10/grupo): 3 grupos fueron vacunados con 0,5 mL por vía intramuscular (IM), subcutánea (SC) o intradérmica (ID) en la zona retroauricular mediante aguja y jeringa; otro grupo se inoculó con una vacuna tradicional monovalente de 2mL/dosis por vía IM. Se evaluó la tolerancia local de la vacuna por palpación a distintos tiempos. Se realizaron sangrías los días 0, 28, 58, 86, y 118 para determinar el título de anticuerpos por seroneutralización viral. Cuando los animales fueron trasladados al frigorífico se realizó un examen patológico en el sitio de inoculación. A los 28 y 56 días post vacunación (dpv) se detectaron pequeños nódulos palpables duros sin temperatura en el 30% (IM), 80% (SC) y 90% (ID) de los animales vacunados con 0,5 mL/dosis, y en el 30% de los animales vacunados con 2mL/dosis, los cuales desaparecieron hacia el final del ensayo. Los resultados del análisis patológico en frigorífico mostraron que una reducción del volumen de vacuna inoculada por vía

IM disminuyó las lesiones en el músculo, mientras que las vías SC e ID eliminaron completamente el daño localizado en tejido muscular. Los resultados de potencia indicaron que la vacuna 0,5 mL/dosis indujo niveles de anticuerpos que superaron el valor de corte establecido para la cepa O1C (1,65) por las tres vías evaluadas (IM: 1,83; SC: 2,14; ID: 2,14). Las vías SC e ID indujeron títulos de anticuerpos superiores a la vía IM. A 58 dpv los títulos obtenidos por las tres vías aumentaron y se mantuvieron por encima del valor de corte hasta los 118 dpv (IM: 1,79; SC: 1,95; ID: 1,93). Con el objetivo de ampliar la cobertura antigénica se formularon tres lotes de vacuna trivalente (cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro y A2001 Argentina) de 0,5 mL/dosis (vacunas A, B y C). Se dispusieron de 60 cerdos de 8 semanas de edad organizados en 6 grupos (n=10 /grupo) correspondientes a las tres vacunas inoculadas por dos vías, SC e ID. Los dos grupos inoculados con la vacuna B fueron revacunados a las 4 semanas. Se midieron los niveles de anticuerpos neutralizantes en todos los grupos a 0 y 28 dpv. Se evaluó la duración de inmunidad hasta los 150 días post primer vacunación en los dos grupos revacunados. Todos los grupos superaron el valor de corte establecido a 28 dpv para las tres cepas vacunales (O1C: 1,65; A24:1,36; A2001:1,43). No se observaron diferencias significativas entre las dos vías de inoculación. La revacunación con la vacuna B produjo un boost en el título de anticuerpos, y los mismos se mantuvieron elevados hasta los 150 dpv. En conclusión, en este trabajo se muestra el desarrollo de una vacuna antiaftosa de volumen reducido (0,5 mL) estable, potente y eficaz para la especie porcina. Las vías de inoculación subcutánea e intradérmica permitieron evitar lesiones en tejido muscular evitando pérdidas económicas causadas por el descarte de carne que ocurre durante la vacunación intramuscular.

3C. INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE A BIOFILMS DE *STAPHYLOCOCCUS NO-AUREUS* EN BOVINOS

Conesa A.^{1,2}; Rampone A.²; Sodero S.G.^{1,2}; Bohl L.P.^{1,2}; Breser M.L.^{1,2}; Isaac P.^{1,2}; Raspanti C.G.³; Porporatto C.^{1,2}

¹ Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CONICET-UNVM), Villa María, Argentina.

² Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, UNVM. Villa María, Argentina.

³ Departamento de Microbiología e Inmunología, FCEFQyN, UNRC, Río Cuarto, Argentina.

*conesa_agu@hotmail.com

Staphylococcus no-aureus (NAS), son agentes etiológicos de infecciones intramamarias bovinas. La patogenicidad de estas especies está asociada a factores de virulencia, como la formación de biofilm. Las rutinas de desinfección pre y post-ordeño y las terapias antibióticas al secado, son ineficientes para prevenir o eliminar infecciones crónicas. La ineficacia de estos procedimientos conduce a buscar métodos de control alternativos, como vacunas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la matriz del biofilm de una cepa NAS aislada de mastitis bovina como inmunógeno, asociado a quitosano o hidróxido de aluminio como adyuvantes. Para ello, se estudiaron cepas aisladas en la cuenca de Villa María, identificadas por métodos bioquímicos y moleculares, se evaluaron factores de patogenicidad y la respuesta inmune inducida. Se evaluó la capacidad de formación de biofilm e interacción con células epiteliales mamarias de la línea comercial MAC-T de las 3 especies de NAS más prevalentes en la zona. Para caracterizar las respuestas inmunes se midió la concentración de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 α inducidas luego de la estimulación *in vitro* de la línea celular con las cepas en estudio (ELISA). Se seleccionó la cepa *S. xylosus* 222 como candidata para obtener el inmunógeno deseado. La misma fue identificada a nivel de especie por PCR-RFLP del gen *gap* y MALDI-TOF MS. Se obtuvo un inmunógeno a partir de una suspensión de la matriz del biofilm de la cepa *S. xylosus* 222, concentrada e inactivada. Para la inmunización se utilizaron 40 vaquillonas Holstein en el último trimestre de gestación, y se las dividió en 4 grupos (n=10). Cada uno de ellos recibió estas formulaciones: grupo no inmunizado (NI): 2 ml de solución fisiológica estéril (SF); grupo inmunizado control (AI): 2 ml del inmunógeno con hidróxido de aluminio como adyuvante (Ad); grupo inmunizado (QI): 2 ml del

inmunógeno con quitosano como Ad; y grupo control de Ad (C): SF + Q. Se aplicaron dos dosis subcutáneas en la tabla del cuello, a los 60 y 30 días previos a la fecha de parto. Se recolectaron 10 ml de sangre de la vena coccígea a los días 0, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 post-inoculación. Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-la matriz del biofilm en suero por ELISA. Para ello, placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con la matriz de biofilm a una concentración de 1x10⁹ UFC/mL, se incubaron los sueros diluidos, se usó un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa y se reveló con una solución de sustrato/cromógeno TMB. Se pudo determinar que las bacterias con menor capacidad de formar biofilm mostraron una internalización significativamente mayor, y la sobrevivida fue significativamente superior para *S. xylosus*. Al evaluar la interacción con MAC-T, sólo esta cepa desencadenó un incremento en la producción de ambas citoquinas. En el ensayo de inmunización *in vivo*, no se observaron reacciones adversas a la inoculación en ningún animal en estudio. En ambos grupos vacunados (QI y AL) se observó un incremento similar en los niveles de IgG séricas específicas, que en sus puntos máximos (14 y 7 días de cada dosis) llegó a ser 50% superior respecto a los controles. Si bien los niveles de anticuerpos comenzaron a decaer a los 7 días de alcanzar el pico, se observó un nivel más sostenido luego de la segunda dosis en los grupos inmunizados. Mediante este estudio fue posible obtener un inmunógeno con una probada actividad *in vitro* e *in vivo* para generar respuesta contra estructuras y componentes bacterianos que cumplen un rol determinante, tanto en las primeras etapas de la interacción huésped-patógeno, como en la permanencia y en la evasión del sistema inmune, y en etapas más avanzadas de la infección.

4C. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA EN EQUINOS INOCULADOS CON GLICOPROTEÍNA D RECOMBINANTE DE ALFAHERPESVIRUS EQUINO 1

Fuentealba N.A.^{1,2}; Azcurra M.B.³; Lopez R.A.⁴; Panei C.J.^{1,2}; Bravi M.E.^{1,2}; Picotto L.D.^{1,2}; Pecoraro M.R.¹; Galosi C.M.⁵

¹ Laboratorio de Virología, FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

² CCT- CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

³ Cátedra de Reproducción Animal, FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

⁴ Cátedra de Medicina Equina, FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

⁵ FCV-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*nadiafuentealba@hotmail.com

El alfa herpesvirus equino 1 (EHV-1) produce signos respiratorios, nerviosos, abortos y síndrome neonatal en equinos. Produce infecciones latentes y ante determinadas situaciones de estrés se reactiva aumentando el riesgo de producir abortos. Los animales no desarrollan inmunidad duradera contra el EHV-1, siendo susceptibles a la reinfección. Existen vacunas inactivadas y atenuadas aunque su eficacia es limitada y la protección es incompleta y de corta duración. En Argentina sólo se permite el uso de vacunas inactivadas, las cuales no estimulan la respuesta celular mediada por linfocitos T citotóxicos y no impide que se produzca viremia asociada a células. Es por eso que mundialmente se continúan investigando inmunógenos y estrategias de inmunización que permitan inducir una respuesta inmune eficiente y duradera. Las glicoproteínas de envoltura de los herpesvirus cumplen un importante rol en el proceso infeccioso y son inductoras de la respuesta inmune, por lo que son fuertes candidatas para elaborar vacunas efectivas. En trabajos previos realizados por nuestro grupo se demostró la capacidad de la glicoproteína D (gD) recombinante de estimular la respuesta inmune mucosal en ratones BALB/c al ser inmunizados por vía intranasal (IN). Por lo tanto, el objetivo que se plantea en este trabajo es evaluar la respuesta inmune en potrillos lactantes ante la inmunización IN con la gD recombinante. Se utilizaron 4 yeguas preñadas, que fueron vacunadas al 5to, 7mo y 9no mes de gestación con la vacuna comercial Pneumabort-K+1B (Zoetis). Se tomaron muestras de sangre 30 días posteriores a cada inmunización y se verificó la presencia de anticuerpos en suero por ELISA y neutralización del virus. Cuando se produjeron los nacimientos, se examinaron a las crías y a las madres para verificar la ausencia de signos clínicos, y cada 15 días se tomaron muestras de hisopados nasales que se procesaron para aislamiento viral y confirmación por PCR. Además, se tomaron muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos. Al detectar

el descenso natural de anticuerpos calostrales en los potrillos, 2 de ellos se inmunizaron por vía IN con dos dosis de gD recombinante purificada (3 mg/dosis) combinada con 50 µg de la subunidad B de la toxina colérica (CTB) como adyuvante, con 21 días de intervalo entre cada dosis. Un potrillo se utilizó como control negativo y no fue inmunizado. A los 7 días de cada inmunización se realizaron lavados nasales aplicando 25 ml de PBS estéril en la cavidad nasal y se colectó el efluente que fue analizado por ELISA para determinar la presencia de IgG e IgA. A 15 días de cada inmunización se sangraron los potrillos para determinar la presencia de anticuerpos en suero. En los sueros de las yeguas luego de cada vacunación se observó un bajo título de anticuerpos, que se mantuvo constante con cada dosis de vacuna. En los sueros de las crías desde el momento del nacimiento, se observó que tres de ellas poseían anticuerpos en muy bajos títulos. Una de las crías murió en el parto por lo que el ensayo continuó con 3 animales. A los 70 días del nacimiento los anticuerpos fueron indetectables, por lo que dos crías fueron inmunizadas con la gD recombinante observándose que el título de anticuerpos en suero volvió a aumentar a los 15 días pos-inmunización y se mantuvo hasta el final del ensayo. Por otro lado se detectó la presencia de IgA en el lavado nasal de un potrillo luego de las dos inmunizaciones con la proteína gD, detectándose también IgG en las mismas muestras. El aislamiento viral a partir de los hisopados nasales tomados a madres y potrillos luego del nacimiento, fue negativo en todos los animales, lo cual fue confirmado por PCR. Los resultados obtenidos nos indican que la gD administrada por vía IN sería capaz de estimular la respuesta inmune en mucosas. Por este motivo se encuentra en desarrollo un nuevo ensayo con equinos para continuar confirmando la efectividad del plan de inmunización temprano en potrillos.

5C. USO DE GALECTINA 8 Y GEL01 COMO ADYUVANTES POTENCIADORES DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR UNA VACUNA GÉNICA CONTRA EL HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (HVBO1) EN BOVINOS

Kornuta C.A.^{1,2}; Langellotti C.^{1,2}; Bidart J.^{1,2}; Soria I.¹; Quattrocchi V.¹; Gammella M.¹; Angeletti P.¹; Tribulatti V.^{2,5}; Campetella O.²; Carabelli J.^{2,5}; Prato C.^{5,6}; Hecker Y.^{2,4}; Cheuquepán Valenzuela F.⁴; Moore D.P.^{2,4}; Zamorano P.^{1,2,3}

¹ Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT, INTA-CONICET);

² CONICET;

³ USAL;

⁴ EEA Balcarce, INTA;

⁵ UNSAM;

⁶ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

kornuta.claudia@inta.gob.ar

En ensayos previos en bovinos con una vacuna a ADN que codifica la versión secretada de la glicoproteína D del Herpesvirus Bovino 1 (HVBo1) denominada pClgD junto con adyuvantes comerciales basados en Montanide, se logró inducir protección parcial frente al desafío viral. En la búsqueda de potenciar la respuesta evaluamos nuevas moléculas sintéticas como la Galectina 8 (Gal8), familia de lectinas solubles con alta afinidad a beta-galactósidos, que logran inducir múltiples respuestas celulares a través de su unión a glico-receptores de la superficie celular. Recientemente demostramos que potencia la respuesta humoral y protectora cuando se aplica junto con el Virus de la Fiebre Aftosa en el modelo murino. En la formulación de la vacuna a ADN proponemos su uso como adyuvante en bovinos y la incluimos junto al adyuvante Montanide™ GEL 01 (GEL01). Cinco grupos de bovinos (n=4/5) de 1-2 años de edad fueron vacunados a los 0, 30 y 60 días con 1) 600µg pClgD; 2) 600µg pClgD-1mg Gal8; 3) 600µg pClgD-GEL01; 4) 600µg pClgD-1mg Gal8-GEL01 o 5) 600µg pClneo como control. A los 90 dpv observamos títulos de anticuerpos totales contra HVBo1, para el grupo pClgD 2,54±0,64; pClgD-Gal8 2,61±0,79; pClgD-GEL01 3,02±0,27 y para pClgD-Gal8-GEL01 3,42±0,08 (superior a pClgD, p<0,01). Los títulos de IgG1 para el grupo pClgD fue de 2,82±0,29; pClgD-Gal8 2,88±0,19; pClgD-GEL01 3,98±0,09 (p<0.001) y para pClgD-Gal8-GEL01 de 4,00±0,22 (p<0.001). Los títulos de IgG2 para pClgD fueron de 2,37±0,14; pClgD-Gal8 2,50±0,67; pClgD-GEL01 2,50±0,67 y para pClgD-Gal8-GEL01 2,65±0,40. A los 90 dpv, el porcentaje de HVBo1 neutralizado por el grupo pClgD fue 9,09%±12,05; pClgD-Gal8 fue 19,69%±10,35 (p<0.05); pClgD-GEL01 fue 21,67%±5,96 (p<0.05) y para pClgD-Gal8-GEL01 fue 17,77%±7,25 (p<0.05) respecto al control. A los 90 dpv los bovinos fueron desafiados con 5 ml de 1x10^{6,81} DICT₅₀/ml de HVBo1 cepa Los Ángeles. Se observó un retraso en la excreción viral de algunos animales tratados

y todos presentaron disminución respecto a pClneo. Una diferencia significativa se observa al día 5 post infección (dpi) para pClgD-Gal8 como pClgD-Gal8-GEL01 (p<0,05) y pClgD-GEL01 (p<0,01) frente a pClgD. En los ensayos de estimulación *in vitro* con pClgD-Gal8-GEL01 (p<0,01) y con pClgD-GEL01 (p<0,05) sobre células dendríticas obtenidas de vasos linfáticos aferentes de bovinos, se indujo regulación positiva de las moléculas de superficie CD40. Hubo regulación positiva con GEL01, pClgD-GEL01 y pClgD-Gal8-GEL01 para MHCII (p<0,001). Para CD86 se indujo estimulación solamente con pClgD-GEL01 (p<0,01). A 12 dpi hubo linfoproliferación específica de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El índice de proliferación indica que un porcentaje mayor de animales del grupo pClgD-Gal8-GEL01 proliferó en contacto con el virus comparado a los demás grupos. En sobrenadante de 12dpi se evaluó secreción de citoquinas por las PBMC estimuladas con virus y se observó un mayor número de animales secretores de IFN γ en el grupo pClgD-Gal8 respecto a los demás. Los resultados demuestran que las formulaciones de la vacuna génica con Galectina 8 y/o con GEL01 lograron inducir y mejorar tanto la respuesta humoral como celular de los bovinos frente al virus a comparación de los resultados obtenidos con la vacuna génica por sí sola. Observamos que Gal8 y GEL01 son capaces de aumentar niveles de anticuerpos en suero y anticuerpos neutralizantes. Hubo disminución en los niveles de excreción viral luego del desafío, dato de suma importancia cuando se evalúan vacunas contra HVBo1. Se verificó la capacidad de las formulaciones de estimular y activar a las células dendríticas *in vitro*. Las formulaciones también fueron capaces de inducir linfoproliferación específica y de inducir la secreción de IFN γ . Seguimos analizando otros parámetros para determinar el rol que ejerce cada vacuna en el sistema inmune de los bovinos tratados.

6C. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE UNA VACUNA NOVEL DE TIPO DIVA CONTRA LA NEOSPOROSIS EN BOVINOS

Mendoza Morales L.F.^{1,*}; Fiorani F.²; Lagorio V.¹; Sánchez López E.F.¹; Corigliano M.G.¹; Cirone K.²; Cheuquepan F.²; Maldonado J.²; Hecker Y.²; Ramos Duarte V.A.¹; Cantón G.²; Moore P.D.²; Clemente M.¹; Sander V.A.¹

¹ Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECh), CONICET/UNSAM. Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)/CONICET, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

*lfmendozam@intech.gov.ar

Neospora caninum es el agente etiológico de la neosporosis, una enfermedad infecciosa mundialmente reconocida como la principal causa de abortos y fallas reproductivas en bovinos. Actualmente no existen tratamientos quimioterapéuticos ni vacunas contra la neosporosis. Un abordaje novedoso es el de las vacunas "DIVA" (del inglés *differentiate infected from vaccinated animals*). En un trabajo previo de nuestro laboratorio demostramos en un modelo murino de neosporosis congénita que la inmunización de ratones BALB/c con una formulación vacunal recombinante novel tipo DIVA, conteniendo el Ag de superficie SAG1 de *N. caninum* (rNcSAG1) y la proteína de choque térmico de 90 kDa de *Arabidopsis thaliana* (rAtHsp81.2) como adyuvante, generó no sólo IgG anti-rNcSAG1 sino también IgG anti-rAtHsp81.2, y otorgó protección parcial contra la infección y la transmisión vertical del patógeno. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos determinar la capacidad inmunogénica y propiedad DIVA de la formulación vacunal propuesta en la especie de interés, *Bos taurus*. Con este propósito, 21 vaquillonas libres de neosporosis fueron divididas en 6 grupos, a los que se les administró, según correspondiera, 2 dosis de cada una de las siguientes formulaciones mediante una inyección subcutánea los 0 y 30 días post inmunización (d.p.i.): (A): 50 µg de rNcSAG1 + 150 µg rAtHsp81.2 (n=4); (B): 200 µg de rNcSAG1 + 600 µg rAtHsp81.2 (n=4); (C): 500 µg de rNcSAG1 + 1500 µg rAtHsp81.2 (n=4); (D): 150 µg rAtHsp81.2 (n=3); (E): 1500 µg de rAtHsp81.2 (n=3); (F): control vehículo (sólo 3 ml de PBS; n=3). Se colectaron muestras de sangre (40 ml) de la vena yugular para evaluar la respuesta inmune humoral a los 0 (pre-inmune), 30 (pre-boost), 45, 60 y 90 d.p.i. Se recuperó el suero, que fue utilizado para realizar la determinación del título de IgG anti-rNcSAG1 y anti-rAtHsp81.2 y los isotipos IgG1 e IgG2 anti-rNcSAG1. Por otro lado, con el objetivo de evaluar la respuesta celular se colectó sangre con heparina a los 60

d.p.i. de todos los animales, a partir de la que se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), que fueron cultivadas en medio DMEM en presencia/ausencia del Ag. (rNcSAG1) por 72 h. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes del cultivo celular para la determinación de secreción de IFN-γ por Elisa. Los sueros de los animales que recibieron las dosis media (grupo B) y alta (grupo C) de la formulación vacunal mostraron altos títulos de anticuerpos IgG e IgG2 anti-rNcSAG1 desde los 30 d.p.i. en adelante, alcanzando valores máximos a los 60 d.p.i. Los animales que recibieron la menor dosis de la formulación vacunal (A) y aquellos correspondientes a los controles de dosis de adyuvante (D y E) o vehículo (F) no mostraron anticuerpos anti-rNcSAG1. No fue posible detectar títulos de IgG1 anti-rNcSAG1 en ninguna de las muestras. Por otro lado, todos los animales a los que se les administró el adyuvante solo (D y E) o en conjunto con el Ag. (A, B y C) mostraron títulos de IgG anti-rAtHsp81.2, obteniéndose los mayores valores a los 60 d.p.i. para los grupos que recibieron la mayor dosis de adyuvante (C y E). Respecto de la respuesta inmune celular, la estimulación con el Ag. de las CMSP provenientes de los animales inmunizados con la mayor dosis de la formulación vacunal (C) indujo la secreción de niveles de IFN-γ significativamente mayores a los del grupo vehículo (F). En conclusión, la inmunización de vaquillonas con la dosis más alta de la formulación vacunal de tipo DIVA conteniendo el Ag. rNcSAG1 y como adyuvante la proteína rAtHsp81.2 es capaz de generar una importante respuesta inmune humoral con la secreción de IgG e IgG2 anti-rNcSAG1 e IgG anti-rAtHsp81.2, así como también de promover la respuesta inmune celular, mediada por la producción de IFN-γ. Estos resultados nos alientan a evaluar su capacidad inmunoprotectora durante la preñez bovina.

7C. EVALUACIÓN DE UN CANDIDATO VACUNAL CONTRA PARATUBERCULOSIS BOVINA UTILIZANDO UN MODELO *EX-VIVO*

Colombatti Olivieri M.A.^{1*}; Moyano R.D.¹; Cuerda X.¹; Griffa N.¹; Alonso N.¹; Mon M.L.¹; Nagel A.¹;
Santangelo M.P.¹; Romano M.I.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO, UE DD INTA-CONICET), Castelar,
Buenos Aires, Argentina.

*colombatti.alejandra@inta.gob.ar

La Paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Afecta principalmente al ganado bovino produciendo una enteritis granulomatosa crónica que resulta en un deterioro progresivo del animal enfermo causando diarreas severas, disminución de la producción e incluso la muerte. Las vacunas contra Map podrían resultar en una buena estrategia para un programa de control de esta enfermedad ya que las pruebas diagnósticas tienen poca sensibilidad para detectar animales en estadios subclínicos. Las vacunas comerciales actualmente disponibles, basadas en cepas de baja virulencia inactivadas, han resultado efectivas en disminuir la eliminación de micobacterias por materia fecal, y el porcentaje de animales con síntomas clínicos, sin embargo protegen parcialmente contra la infección por Map. La utilización de cepas aisladas en nuestro país (con determinantes antigénicos que circulan en Argentina) podrían resultar mejores candidatos vacunales. Las agencias reguladoras y los laboratorios productores de biológicos buscan nuevos métodos que permitan reemplazar o disminuir la cantidad de animales utilizados para evaluar vacunas. La utilización de un sistema *ex-vivo* de cultivo de células mononucleares de sangre periférica, que simule el modelo clásico de desafío experimental *in-vivo*; permitiría reducir el tiempo y los recursos necesarios para evaluar dichos candidatos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la vacunación a través del sistema *ex-vivo* por la infección *in-vitro* de células mononucleares de sangre periférica de animales vacunados. Se utilizaron 21 terneros (raza Aberdeen Angus), entre 1-3 meses de edad, fueron divididos en 3 grupos. 1- Grupo control: Inoculado

subcutáneamente con solo adyuvante oleoso (W/O/W) Montanide ISA 201 (Seppic S.A.), 2- Vacunados con la vacuna comercial Silirum® y 3- Vacunados con la cepa local virulenta 6611 inactivada administrada con adyuvante Montanide ISA 201. A los 4 y 8 meses post-vacunación (mpv), se realizó la extracción de sangre periférica para obtención suero para evaluar la presencia de anticuerpos (ELISA-PPA3) y para la obtención de células mononucleares. Las células fueron cultivadas en placas de 96 wells fondo plano RPMI suplementado con glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato, 12% suero autólogo, anfotericina B y ampicilina. Luego de 24h, las células fueron infectadas con una MOI de 1:1 (5×10^5 UFC/well) con una cepa virulenta de Map (cepa 1347/498). La misma fue previamente incubada a 37°C durante 1h en el medio de cultivo completo con suero autólogo. Se evaluó la sobrevida de Map a los 2 y 4 días post-infección. Para ello se lisaron las células con triton-X al 0,1% y se sembraron diluciones seriadas en agar Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC y micobactina. En ambos grupos vacunados los animales fueron positivos al ELISA de PPA3, obteniendo densidades ópticas mayores en el grupo vacunado con la cepa local 6611. Solo a los 4 mpv se observó una reducción significativa del recuento de unidades formadoras de placa (UFC) de Map en el sistema *ex-vivo* luego de 4 días de infección, siendo más significativo para el grupo vacunado con la cepa local 6611 inactivada. Los animales vacunados tuvieron una mayor capacidad en limitar la replicación y sobrevida de Map. Si bien ambas vacunas tienen una respuesta similar, la misma fue mayor con la cepa local 6611.

8C. EVALUACIÓN DE UN ADYUVANTE ORAL PARA AVES

Lucero M.S.¹; Jatón J.¹; Chimeno Zoth S.¹; Pinto S.²; Berinstein A.¹; Cassataro J.³; Gómez E.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), INTA-CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

² Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Patología, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), UNSAM- CONICET, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

*lucero.soledad@inta.gob.ar

La vacunación por vía de mucosas requiere de altas cantidades de proteína debido a la degradación que pueden sufrir los antígenos en el tracto gastrointestinal, y/o la adición de adyuvantes adecuados que permitan lograr una respuesta inflamatoria en vez de tolerógena. Omp19 es una lipoproteína de la membrana externa de *Brucella* spp. que ha demostrado tener efectos adyuvantes cuando es coadministrada con antígenos modelo o proteínas de patógenos por vía oral a ratones. Su capacidad adyuvante radica en el impacto que tiene en la respuesta celular, en el reclutamiento y maduración de células dendríticas y en su función como inhibidor de proteasas que podría aumentar la vida media del antígeno en el tejido linfóide asociado a mucosas. La utilización de Omp19 como inmunomodulador en estrategias de vacunación ante patógenos aviares aún no ha sido descripta. La Enfermedad infecciosa de la bursa (IBD) es una enfermedad viral altamente contagiosa e inmunosupresora que afecta pollos jóvenes a nivel mundial. Los principios básicos para el control de la misma se basan en medidas de higiene y bioseguridad y en programas adecuados de vacunación. Nuestro grupo ha desarrollado un candidato vacunal para IBD basado en la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* de VP2, la proteína de cápside del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) y principal inductora de la inmunidad protectora. Este inmunógeno ha demostrado ser capaz de proteger a pollos frente a la infección con IBDV al ser administrado por vía intramuscular (im.) pero no por vía oral. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto adyuvante de Omp19 al ser coadministrada con VP2 por vía oral a pollos. Para ello, dos grupos de 6 animales de fueron inmunizados por vía

oral con extracto de planta (60 µg de VP2) en presencia o ausencia de 200 µg de la versión no lipidada (U) de Omp19 producida en *E.coli*. a los 14 y 28 días de edad. Otros dos grupos recibieron un prime del inmunógeno por vía im. (30 µg de VP2) seguido de un refuerzo por vía oral con o sin U-Omp19 a los mismos tiempos. Tres semanas luego de la última inoculación, los pollos fueron desafiados con 10³ EID de una cepa clásica virulenta de IBDV y sacrificados siete días después. Se realizaron sangrías exploratorias para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra VP2 y se tomaron muestras de la bursa de Fabricio para estimar la carga viral y el daño histopatológico en este órgano luego de la infección. Todos los animales que recibieron dos dosis orales de VP2 en ausencia de adyuvante mostraron lesiones en la bursa y alta carga viral luego del desafío. Sin embargo, la coadministración de U-Omp19 con VP2 fue capaz de generar una respuesta inmune protectora contra IBDV evidenciada por la ausencia de daño histológico y la baja carga viral en 5 de los 6 animales. Además, los animales que recibieron un prime im. seguido del refuerzo oral resultaron parcialmente protegidos frente al desafío mientras que la adición de U-Omp19 como adyuvante resultó en un 100% de protección. Estos resultados demuestran, por un lado, que la administración del antígeno por vía oral es eficaz como refuerzo luego de una inoculación parenteral pero no para primar la respuesta a menos que el antígeno sea adyuvado y, por otro lado, que U-Omp19 es un adyuvante oral efectivo en aves. La identificación de nuevos adyuvantes mucosales para aves contribuirá a la generación de vacunas orales a subunidad efectivas y seguras.

9C. CÁPSIDES VACÍAS DE VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA SEROTIPO A/ARG/2001 Y UN ADYUVANTE TIPO ISCOMS COMO CANDIDATO PARA VACUNA

Bidart J.E.^{1,2*}; Mignaqui A.²; Kornuta C.^{1,2}; Lupi G.³; Langellotti C.^{1,2}; Mongini C.^{1,2}; Quattrocchi V.¹; Wigdorovitz A.¹; Marcipar I.^{2,3}; Zamorano P.^{1,2,4}

¹ Instituto de Virología e innovaciones Tecnológicas (IVIT), INTA-CONICET.

² CONICET.

³ Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL.

⁴ Universidad del Salvador.

*bidart.juan@inta.gob.ar

La Fiebre Aftosa es una enfermedad aguda y económicamente importante provocada por el Virus de Fiebre Aftosa (VFA). Se busca desarrollar nuevas vacunas que no utilicen VFA infeccioso por el riesgo de escape viral y que permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Las Virus-like particles (VLPs) mantienen los sitios antigénicos del virión. Se utilizaron VLPs del serotipo A/Arg/01 obtenidas en células 293E mediante transfección transitoria, en suspensión. El ISPA (Immunostimulant Particle) es un adyuvante tipo ISCOM de origen nacional. En este trabajo se evaluó la capacidad inmunogénica y protectora de las VLPs formuladas con ISPA como vacuna frente al VFA en el modelo murino. En el modelo murino, desarrollado en nuestro laboratorio, se evaluó la protección inducida por las vacunas frente a desafío con VFA infeccioso. La inmunidad humoral se evaluó mediante: ELISA (sándwich, y en fase líquida, de isotipos) y seroneutralización. La inmunidad celular se evaluó mediante: linfoproliferación utilizando esplenocitos (marcación con CFSE) y marcación de superficie e intracitoplasmática. Curva dosis respuesta: se vacunaron ratones con concentraciones crecientes de VLPs (1; 0,5; 0,3 y 0,15 µg/d) a los 0 y 21 d, y desafiados 36 dpv con VFA A2001 infeccioso. Se escogió 0,5 µg/d que induce protección en el 40% de los animales vacunados y desafiados. Se inmunizaron ratones BALB/c (n=5 por grupo) con VLPs; VLPs-ISPA; VLPs-adyuvante comercial (ISA206); ISPA; PBS y Vacuna Comercial; los días 0 y 21, y desafiados a los 36 dpv. A los 34 dpv los Acs αVFA inducidos fueron: 1,00±0,01; 2,7±0,2; 2,3±0,3; 2,7±0,3 en VLPs, VLPs-ISPA, VLPs-ISA206 y vacuna comercial

respectivamente. Los títulos VLPs-adyuvante demostraron ser significativamente superiores a VLPs (p<0,001) y similares a la vacuna comercial. Se observó un incremento significativo de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en los grupos VLPs-ISPA y VLPs-ISA206 con respecto a VLPs. Título de neutralización viral: VLPs-ISA206:1,41±0,02; VLPs-ISPA: 1,05±0,06 y vacuna comercial: 1,76±0,08. Se desafiaron los ratones con VFA A2001 36 dpv y se observó una protección del 100% frente al desafío en los grupos: VLPs-ISA206; VLPs-ISPA y vacuna comercial. En el grupo VLPs, el 40% de los individuos estuvo protegido. Los grupos ISPA y PBS no mostraron protección. A los 36 dpv, en el grupo VLPs-ISPA se detectó una mayor proliferación que en el grupo VLPs (p<0,05) cuando los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con VFA inactivo, aunque menor que con vacuna comercial (p<0,001). Se observa un aumento en la población CD8+/IFNγ+ en los animales vacunados con VLPs-ISPA en relación a los vacunados con VLPs (p<0,05). Las formulaciones de VLPs serotipo A/Arg/2001 recombinante resultaron efectivas en la generación de inmunidad humoral, celular y protección frente al desafío con VFA infeccioso en el modelo murino. El ISPA muestra una actividad adyuvante importante para las vacunas contra la FA, aumentando y modulando las respuestas inmunes en ratones vacunados y proporcionando una mayor protección frente al desafío. Lo que lo convierte a VLPs-ISPA en un interesante candidato vacunal contra el VFA, ya que no se utiliza virus infeccioso para su preparación y utiliza un adyuvante de fabricación nacional distinto al usado en la vacuna comercial.

10C. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA CUATRO PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *NEOSPORA CANINUM* FORMULADAS CON LIPOSOMAS Y ODN-CPG EN BOVINOS

Novoa, M.B.^{1,2}; Sarli, M.^{1,2}; Reidel, I.G.^{2,3}; Signorini, M.L.^{1,2}; Veaute, C.M.I.³; Echaide, I.E.¹; Primo, M.E.^{1,2}

1 EEA Rafaela, INTA;

² CONICET;

³ Laboratorio de Inmunología Experimental, FCB UNL.

*novoa.maria@inta.gob.ar

Neospora caninum es un parásito protozoario intracelular obligado del phylum Apicomplexa. La neosporosis es una de las principales causas de aborto en los bovinos. Para controlar la infección y el aborto producido por *N. caninum* se requiere una respuesta inmune de tipo Th1, con producción de inmunoglobulinas de isotipo IgG2. Los anticuerpos específicos controlan la expansión inicial en la fase de multiplicación rápida, facilitando la lisis de los parásitos extracelulares. Distintas proteínas de *N. caninum* se probaron como inmunógenos en ratones y en bovinos, logrando una protección parcial. El adyuvante utilizado en la formulación de una vacuna, es un factor clave para dirigir la respuesta inmune hacia el perfil necesario e incrementar su eficacia. Se evaluó la respuesta inmune humoral (IgG total, IgG1 e IgG2) generada por un inmunógeno constituido por las proteínas recombinantes MIC1, MIC3 (micronemas), SRS2 (superficie de los taquizoitos) y GRA7 (gránulos densos) de *N. caninum*, formulado con liposomas catiónicos (Lip) y oligodesoxinucleótidos CpG no metilados (ODN-CpG) como adyuvante. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *Escherichia coli* con una cola de 6 histidinas, y purificadas en una columna de NTA-Níquel. Los Lip se obtuvieron a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol y estearilamina (7:2:2 molar) por el método de Inyección Etanólica. El agregado de ODN-CpG se realizó sobre las formulaciones pre-armadas previo a las inoculaciones. Se utilizaron 18 novillos de 3 años de edad divididos al azar en 3 grupos (G). Los animales fueron inmunizados por vía SC con dos dosis (día 0 y 21) de las siguientes formulaciones: GA: Lip+ODN-CpG + 100 µg de cada proteína recombinante, GB: Lip+ODN-CpG, GC: PBS. Los novillos fueron desafiados con 1×10^8 taquizoitos de la cepa

NC-1 de *N. caninum* en el día 56. Se tomaron muestras de suero semanalmente hasta el día 102. Los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 específicos para cada antígeno se evaluaron mediante ELISAs indirectos (ELISAI) basados en cada una de las proteínas recombinantes. Los niveles de anticuerpos inducidos contra las proteínas recombinantes se compararon entre grupos mediante un modelo lineal generalizado de mediciones repetidas con distribución gamma, según la distribución de la variable de respuesta. Los animales del GA mostraron un incremento significativo en los niveles de IgG contra las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2, 7 días después de la segunda inmunización ($p < 0,05$). No hubo incremento significativo en los niveles de IgG contra GRA7. Siete días después del desafío, los niveles de IgG contra MIC1, MIC3 y GRA7 aumentaron en los animales del GA. Los niveles de IgG contra SRS2 aumentaron en los animales de los 3 grupos. Siete días después de la segunda inmunización y del desafío, los niveles de IgG1 contra las 4 proteínas recombinantes fueron significativamente mayores en los animales del GA ($p < 0,05$). Los niveles de IgG2 contra las proteínas MIC1, MIC3 y SRS2 fueron significativamente mayores en los animales del GA luego de la segunda inmunización ($p < 0,05$). Esta diferencia no fue observada luego del desafío. Los resultados demuestran que las proteínas recombinantes formuladas con Lip + ODN-CpG fueron capaces de inducir una respuesta inmune humoral específica con la producción de IgG1 e IgG2. La producción de IgG2 indicaría la estimulación de un perfil de respuesta inmune celular del tipo Th1, asociado a la protección frente a la infección con *N. caninum*.

11C. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOESTIMULANTE DEL GINSENÓSIDO RG1 EN CÉLULAS MAMARIAS BOVINAS *IN VITRO*

Silvestrini P.¹; Beccaria C.¹; Engler C.¹; Renna M.S.^{1,2}; Cellone, I.²; Calvinho L.^{2,3}; Dallard B.^{1,2}; Baravalle C.^{1,2}

¹ Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, UNL-CONICET, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

² Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

³ EEA-INTA, Rafaela, Santa Fe, Argentina.

*paula.silvestrini@yahoo.com.ar

La terapia antibiótica para el tratamiento de mastitis bovina es uno de los pilares de los programas de control frente a esta enfermedad, sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha llevado a la generación de cepas bacterianas resistentes y a la aparición de residuos en leche. En los últimos años, la utilización de compuestos inmunomoduladores como nueva alternativa terapéutica y/o preventiva está en auge. Nuestro grupo de trabajo ha centrado las investigaciones en el estudio del extracto de *Panax ginseng* (Pg) como inmunomodulador, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Los ginsenósidos (saponinas), principales componentes activos de este extracto, han sido utilizados como adyuvantes en vacunas de uso veterinario. Uno de los ginsenósidos más abundantes es el Rg1, constituyendo entre el 0,37-0,50% de un extracto de Pg. En base a estos antecedentes, el objetivo del trabajo fue evaluar el potencial inmunomodulador de Rg1 en células epiteliales mamarias y macrófagos bovinos *in vitro*. Con el fin de caracterizar la respuesta inmune inducida luego del tratamiento con Rg1 en una línea de células epiteliales mamarias bovinas (Transformed mammary epithelial cells, MAC-T) y en un cultivo primario de macrófagos aislados de secreciones mamarias de vacas Holando Argentino a los 14 días de la interrupción de la lactancia, se evaluó la expresión de ARNm por PCR en tiempo real de los receptores de reconocimiento tipo toll -2 y -4 (TLR-2 y TLR-4) y de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Brevemente, las MAC-T fueron tratadas con 10, 20, 50 y 100 μ g de Rg1/ml durante 2, 6 y 24 h mientras que los macrófagos fueron tratados con 50, 100 y 250 μ g de

Rg1/ml durante 2, 4, 8, 12 y 24 h. Paralelamente, ciertos pocillos fueron incubados con medio de cultivo como grupo control. En forma complementaria, en los macrófagos tratados con Rg1 (125 y 250 μ g/ml), se evaluó la expresión de CD14 (monocitos/macrófagos) y de CMH-II y CD80 como marcadores de activación mediante citometría de flujo. Como control positivo de activación se utilizaron LPS (2,5 μ g/ml) y LTA (2,5 μ g/ml). No se observaron diferencias en los niveles de expresión génica de TLR-2, TLR-4 y de citoquinas pro-inflamatorias en células epiteliales y macrófagos, entre las células tratadas con diferentes concentraciones de Rg1 y controles para ninguno de los genes evaluados ($p > 0,05$). Por otro lado, en la población CD14+, tampoco se observaron diferencias en la expresión de CMH-II y CD80 entre las diferentes concentraciones de Rg1 utilizadas ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos permiten concluir que las concentraciones de Rg1 utilizadas en los ensayos con MAC-T y macrófagos, no lograron estimular la expresión receptores de la inmunidad innata ni inducir una respuesta pro-inflamatoria. Por otra parte, la falta de activación de los macrófagos aislados de secreción mamaria luego del tratamiento con Rg1 y con los estimulantes inespecíficos, podría deberse a que estas células al momento de la obtención, se encuentren funcionalmente comprometidas con el proceso de remodelación normal de la glándula mamaria durante la involución. Por lo tanto, a los fines de continuar con la evaluación del potencial inmunostimulante del Rg1, se plantea la necesidad de realizar nuevos ensayos empleando células mononucleares de sangre periférica.

SESIÓN IV: RESPUESTA INMUNE A INFECCIONES

1D. PRODUCCIÓN DE IFN- γ EN RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON GENOTIPOS ATÍPICOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Bernstein M.^{1,2*}; Pardini L.^{1,2}; Campero L.M.^{1,2}; Helman M.E.^{1,2}; Unzaga J.M.¹; Venturini M.C.¹; Moré G.^{1,2}

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), FCV-UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina.

*mbernstein@fcv.unlp.edu.ar

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario capaz de infectar animales endotermos, incluido el hombre. Su estructura poblacional es muy diversa en América Central y del Sur, predominando los genotipos atípicos. Cuando se estudiaron algunos genotipos atípicos mostraron diferente comportamiento biológico en ratones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de interferón gamma (IFN- γ) en ratones infectados experimentalmente con aislamientos de *T. gondii* obtenidos de *Macropus rufogriseus* (*TgMr*) y *Saimiri boliviensis* (*TgSb*). Los aislamientos *TgMr* y *TgSb* fueron identificados genotípicamente en la ToxoDB (www.toxodb.org) como atípicos, # 14 y # 163, respectivamente. Se formaron 5 grupos de ratones Swiss hembra SPF (6 ratones/grupo) con los aislamientos de *T. gondii* mencionados y las cepas de referencia ME49 (# 1, tipo clonal II) y VEG (# 2, tipo clonal III). Se utilizó PBS para el grupo control negativo (CN). Los ratones se controlaron durante 30 días y ante la presencia de signos compatibles con toxoplasmosis fueron sacrificados. Al momento de la necropsia se tomó un tercio del bazo de cada ratón para el ensayo de linfoproliferación. El órgano se disgregó entre portaobjetos esmerilados y se lisaron los glóbulos rojos con solución de cloruro de amonio. Los esplenocitos se contaron en cámara de Neubauer con la coloración vital de azul tripán al 0,5% y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos en una concentración de 2×10^5 células viables por pocillo en 200 μ l de medio de cultivo. Se realizaron 4 tratamientos por triplicado por cada bazo procesado: 1- Estimulación con antígeno de lisado total parasitario (TLA) de la cepa RH (# 10) de *T. gondii* (10 μ g / ml). 2- Estimulación con TLA a partir de taquizoitos homólogos (mismas cepas y aislamientos) (10 μ g / ml). 3- Estimulación con concanavalina A (5 μ g / ml) como control positivo. 4- Células sin estimular como control negativo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con

5% de CO₂ durante 72 h, los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20°C hasta su análisis. El IFN- γ se midió con un ELISA comercial. Se aplicó la transformación log₁₀ a los valores de producción de IFN- γ obtenidos mediante ELISA y se analizaron mediante ANOVA y posterior LSD Fisher. Se estableció una $p < 0,05$ como diferencia significativa para todos los análisis. Los ratones inoculados con los aislamientos atípicos fueron sacrificados entre los 8 – 10 días post infección, mientras que los inoculados con las cepas de referencia se sacrificaron al final del ensayo junto con el grupo CN. El estímulo con TLA de RH indujo la producción de niveles significativamente altos de IFN- γ en los sobrenadantes de los ratones infectados con los aislamientos *TgMr* y *TgSb* (promedio 17333,33 pg/ml y 12542,59 pg/ml, respectivamente). Ambos aislamientos indujeron producciones mayores que las cepas clonales ME49 y VEG (promedio 2977,78 pg/ml y 3811,11 pg/ml). La producción extremadamente alta de IFN- γ a partir de los esplenocitos de los ratones infectados podría indicar un mayor número de linfocitos efectores. El único desafío con TLA homólogo que produjo una respuesta diferente fue el TLA de *TgMr*, produciendo niveles más elevados en los cultivos comparado al desafío con TLA de RH. Es probable que el aislamiento *TgMr* exprese antígenos diferentes que podrían actuar como factores de virulencia e inducir una sobreproducción de IFN- γ en los animales infectados. Por lo tanto, la respuesta inmune adaptativa generada por estos aislamientos genotípicamente atípicos podría contribuir a la patogénesis y al desenlace fatal de la enfermedad. En síntesis, la sobreproducción de IFN- γ en ratones infectados con *TgMr* y *TgSb* podría relacionarse con la expresión/secreción de moduladores de la respuesta inmune por parte de estos protozoos.

2D. ESTUDIO DEL ROL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PLANCTÓNICO O BIOFILM

Bohl L.P.^{1*}; Bosco C.²; Isaac P.¹; Breser M.L.¹; Conesa A.¹; Orellano M.S.¹; Correa S.³; Tolosa de Talamoni N.⁴; Porporatto C.¹

¹ Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CITVM-CONICET), Villa María, Córdoba, Argentina.

² Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional Villa María. Villa María, Córdoba, Argentina.

³ Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba Capital, Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba Capital, Córdoba, Argentina.

*lubohl@gmail.com

La mastitis bovina es una infección de la glándula mamaria que provoca su inflamación. Bacterias u otros microorganismos (hongos y virus) son las causas principales de mastitis. El modo de crecimiento bacteriano en biopelículas -o biofilm- ha cambiado la forma en que se estudian las interacciones entre los patógenos y las células huésped en el laboratorio. La formación de biofilm se considera una ventaja selectiva para los patógenos y ha sido asociada a la persistencia bacteriana en la ubre, la recurrencia de la enfermedad, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos y la evasión a la respuesta inmune del huésped. Adicionalmente, se ha propuesto que las células epiteliales mamarias son actores principales en el inicio de la respuesta inmune innata, sin embargo, pocos estudios han abordado el papel de estas células en la inmunidad de la glándula mamaria contra patógenos de mastitis bovina formadores de biofilm. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune innata *in vitro* de células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus* en modos de vida libre (planctónico) y en biofilm. Se utilizó la cepa formadora de biofilm *S. aureus* V329 (aislada de mastitis subclínica), una mutante biofilm negativa (*S. aureus* V329 Δ bap Δ ica) y la línea celular MAC-T (epiteliales de glándula mamaria bovina). En primer lugar se estudió la invasión bacteriana mediante el ensayo de exclusión con gentamicina, implementando tres metodologías experimentales que difieren en el modo de representar las biopelículas. Luego, se eligió una de las metodologías para estudiar: 1- la viabilidad celular utilizando la técnica de exclusión de azul de tripán, 2- la expresión del receptor de reconocimiento tipo Toll (TLR) 2 por citometría de flujo, 3- la producción de citoquinas IL1 β e IL6 mediante ELISA y 4- la expresión génica de IL8 y TNF α por retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. El análisis estadístico de los datos se realizó con test t, ANOVA/Bonferroni o Kruskal Wallis

según corresponda (*p <0.05). Los resultados de invasión bacteriana mostraron diferencias en función al modelo experimental utilizado. La internalización de *S. aureus* V329 en las MAC-T fue significativamente menor cuando estas células se co-cultivaron con biofilm en comparación con las bacterias en vida libre. *S. aureus* V329 planctónico afectó la viabilidad de las MAC-T después de 6 h de co-cultivo, mientras que las biopelículas lo hicieron a las 24 h de infección. En comparación con las células no infectadas, los cultivos planctónicos estimularon la expresión de TLR2 (4 h de infección), mientras que la expresión del receptor fue intermedia en células MAC-T co-cultivadas con las biopelículas. La expresión génica de IL8 aumentó en las células MAC-T infectadas con *S. aureus* V329 en ambos modos de vida en comparación con MAC-T no infectadas, mientras que la expresión de TNF α no se modificó (4 h de co-cultivo). En general ambos estilos de vida estimularon la liberación de IL1 β e IL6 (2 y 4 h de co-cultivo). En conclusión, aunque las metodologías empleadas en este trabajo han sido utilizadas indistintamente por otros investigadores para evaluar las interacciones entre los biofilm y las células huésped, los datos obtenidos indican que el método afecta los resultados. El estilo de vida bacteriano afecta la invasión bacteriana diferencialmente, sugiriendo que las biopelículas interaccionan menos con las células epiteliales e inducen menor reconocimiento. Asimismo, los cultivos planctónicos inducen una activación celular mayor que las biopelículas. Los resultados aportan evidencias para comprender el rol de las células epiteliales en el inicio de la respuesta inmune innata a infecciones por bacterias planctónicas o en biofilm. El conocimiento básico de la interacción entre las biopelículas bacterianas y el huésped es necesario a fin de diseñar terapias nuevas y más eficaces contra la mastitis bovina.

3D. TUBERCULOSIS BOVINA. EVALUACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS EN ANIMALES QUE RESPONDEN EN FORMA DIFERENTE A LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS QUE MIDEN RESPUESTA CELULAR Y HUMORAL

Griffa N.¹; Bermejo V.²; Moyano R.D.¹; Alonso N.¹; Colombatti A.¹; Martino F.³; Delgado F.V.²; Romano M.I.¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CONICET, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

³ Médico Veterinario de los Tambos de Suardi Santa Fe.

*natanaelgriffa@gmail.com

La tuberculosis bovina (TBB), enfermedad producida por *Mycobacterium bovis*, es altamente prevalente, principalmente en los rodeos lecheros en nuestro país, y considerada una de las zoonosis más importantes (Magnano G. 2012, 1997; Garro C. 2011). Los programas de erradicación de TBB están basados en la detección de los animales infectados y su eliminación del rodeo (Donnelly CA. 2015; SENASA/SAGPyA. 2012). La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) por la inoculación intradérmica (IDR) de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-B) es el diagnóstico oficial de TBB en nuestro país (Bernardelli A. 2007). Un inconveniente que se le atribuye a la IDR con PPD-B, es que animales infectados, en determinados estados fisiológicos, dan falsos negativos a esta prueba. Trabajos recientes refieren que estos últimos animales, anérgicos a los test que miden respuesta celular, pueden detectarse utilizando pruebas que miden inmunidad humoral, como es el caso de la técnica de ELISA (Buddle BM. 2013; Casal C. 2014). También se han descrito falsos negativos a la PPD-B por desensibilización (Coad M. 2010). De acuerdo a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar poblaciones linfocitarias de animales que responden

de forma diferente a las pruebas diagnósticas. Para lo cual se evaluaron las poblaciones linfocitarias (CD4, CD8, WC1 y CD21) de 30 animales: 10 PPDB+/ELISA-, 10 PPDB-/ELISA+ y 10 PPDB-/ELISA-, también se evaluaron linfocitos B (CD 21) a través de inmunohistoquímica en tejidos con lesiones tuberculosas. Se vio que las poblaciones CD4, CD8 y WC1 de los animales PPDB+ estaban aumentadas significativamente y respondían al estímulo con PPDB, a diferencia de las poblaciones de los animales PPDB-/ELISA+ y los PPDB-/ELISA-. En cuanto a los CD21, se vio que los animales ELISA+/PPDB- tenían significativamente menor cantidad de linfocitos B que los animales PPDB+. Tampoco encontramos aumento de esta última población en las lesiones de los animales ELISA+/PPDB-. Con esto se logró ver que los animales PPDB-/ELISA+ tienen sus poblaciones linfocitarias (CD8, CD4 y WC1) disminuidas significativamente, aportando mas evidencia del estado anérgico de los mismos. Esto nos demuestra la importancia de seguir estudiando y mejorando técnicas que midan respuesta humoral para disminuir los animales falsos positivos que quedan dentro los rodeos y mantienen de esta forma la enfermedad.

4D. ELUCIDANDO EL ROL DE LA PROTEÍNA RHOGEF *KALRN* EN LA INFECCIÓN CON *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Rossi U.A.^{1,3*}; Caffaro M.E.²; Hasenhauer F.C.^{1,3}; Garbaccio S.¹; Poli M.A.²; Rossetti C.A.¹

¹ Instituto de Patobiología,

² Instituto de Genética, CICVyA-CNIA, INTA. Nicolás Repetto y de Los Reseros s/n, Hurlingham, Buenos Aires (B1686), Argentina.

³ CONICET, Buenos Aires, Argentina.

*ursula.a.rossi@gmail.com

La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica infecto-contagiosa de gran impacto económico. *Mycobacterium bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis bovina, puede sobrevivir y replicar en macrófagos gracias a su capacidad de modular el tráfico vesicular. *M. bovis* modifica la activación y reclutamiento de GTPasas de la familia Rab, inhibiendo la maduración del fagosoma que lo contiene y su fusión con los lisosomas. El gen *KALRN* codifica para una proteína quinasa rhoGEF que regula el tráfico vesicular, y que es necesaria para la replicación del virus HIV en macrófagos humanos. Fue reportado que esta proteína rhoGEF interactúa con Rab11, pero se desconoce la importancia de dicha interacción. Varios polimorfismos en el gen *KALRN* fueron asociados con un aumento en la susceptibilidad a la infección con *M. bovis* y *M. avium* subsp *paratuberculosis* en bovinos, y a la infección con *Brucella* spp. en caprinos. Pero todos estos polimorfismos son de baja frecuencia poblacional ($\leq 0,05$), y en ningún caso se logró elucidar un rol funcional en la expresión de *KALRN* y el desarrollo de la infección intracelular. Como paso inicial en el estudio del rol de *KALRN* en infecciones intracelulares de interés pecuario, nos propusimos realizar un estudio de asociación entre el polimorfismo de Inserción-Delección rs384223075 (InDel *KALRN*-75) y la resistencia a la infección con *M. bovis* en el ganado bovino lechero. Se utilizaron muestras de ADN de 130 vacas lecheras pertenecientes a dos rodeos ubicados en las provincias de Córdoba y Buenos Aires. Se seleccionaron 32 casos y 32 controles de un total de 4.000 bovinos Holstein con una prevalencia de tuberculosis bovina del 15%. Las muestras restantes (32 casos y 34 controles) se seleccionaron de un rodeo de 1.500 bovinos Jersey con una prevalencia del 5%. Los animales fueron clasificados como casos o controles según el resultado positivo o negativo a la prueba de tuberculina ano-caudal (PAC). La región genómica que contiene el InDel *KALRN*-75 se amplificó por PCR utilizando el método de marcado M13-tailing, y los alelos se resolvieron por

electroforesis capilar. Se determinó la asociación genética entre el InDel *KALRN*-75 y el resultado de PAC utilizando el test exacto de Fisher con el programa VassarStats. El InDel *KALRN*-75 está ubicado en el intrón 5 del gen *KALRN*, es de alta frecuencia poblacional y se encuentra en desequilibrio de ligamiento con dos SNPs missense ubicados en el exón 5. Las frecuencias genotípicas mostraron concordancia con el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en el grupo de los controles ($p = 0,97$) como en el grupo de los casos ($p = 0,89$). La frecuencia del alelo menor (delección, "k") para *KALRN*-75 fue mayor en los casos (0,27) que en los controles (0,12), y esta diferencia resultó significativa ($p = 0,003$). Más aún, el genotipo homocigota mayor para *KALRN*-75 (KK) fue asociado con un resultado negativo para PAC ($p = 0,006$; Odds Ratio = 3,00; CI = 1,41 – 6,39). Mientras que en los controles la frecuencia del genotipo KK (alelo mayor) fue de 0,77, en los casos fue solo de 0,53. La asociación se mantuvo significativa al analizar cada rodeo por separado (Holstein: $p = 0,026$; Jersey: $p = 0,029$). Estos resultados sugieren que la delección en *KALRN*-75 (alelo "k") confiere susceptibilidad frente a la infección con *M. bovis*. Por un lado, estos resultados preliminares alientan el estudio del InDel *KALRN*-75 como un marcador molecular para la selección de animales reproductores genéticamente resistentes a la infección con *M. bovis*. En el presente, estamos ampliando el tamaño muestral de este estudio de asociación, y complementándolo con otro estudio en brucelosis bovina. Por otro lado, este trabajo junto a otros sustentan un rol importante, aunque poco estudiado, de *KALRN* en la respuesta inmune a infecciones intracelulares. El polimorfismo *KALRN*-75 representa una buena herramienta para el estudio del rol de la proteína rhoGEF *KALRN* en la replicación bacteriana intracelular en macrófagos bovinos.

5D. POLIMORFISMOS GÉNICOS DEL SISTEMA INMUNE INNATO ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA NATURAL A LA BRUCELOSIS CAPRINA

Hasenauer F.C.^{1,3}; Rossi, U.A.^{1,3}; Caffaro, M.E.²; Raschia A.²; Cortez, H.S.³; Neumann, R.³; Salatin, A.³; Poli, M.A.²; Rossetti, C.A.¹

¹ Instituto de Patobiología,

² Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CICVyA-INTA, Buenos Aires, Argentina.

³ CONICET.

⁴ Área de Salud Animal, IIACS-INTA, Salta, Argentina.

*ursula.a.rossi@gmail.com

Brucella melitensis es el agente causal de la brucelosis caprina, una enfermedad zoonótica que produce pérdidas económicas en el sector productivo e impacta en la salud pública. En estudios previos, hemos informado la asociación de polimorfismos en los genes caprinos *NRAMP1*, *PTPRT*, *IFNGR1* e *IRF3* con la mayor o menor probabilidad de contraer brucelosis. El objetivo aquí fue identificar polimorfismos moleculares en otros genes candidatos del sistema inmune innato que afecten el resultado de la infección por *Brucella melitensis* en caprinos. Se realizó un estudio de casos-controles en tres majadas caprinas criollas no emparentadas de la provincia de Salta, Argentina. Se extrajo ADN genómico del bulbo piloso de animales serológicamente negativos a brucelosis mediante la prueba de antígeno bufferado en placa (BPA; controles, n=83), y de animales serológicamente positivos a BPA y al test polarización fluorescente (FPA; casos, n=61). Basados en referencias bibliográficas y usando la base de datos dbSNP del NCBI, se seleccionaron los siguientes marcadores moleculares relacionados al sistema inmune innato: IFN- γ (microsatélite en intrón1), TNF α (InDel en intrón 1), MYD88 (InDels rs63, rs66 y rs64 en la región 3' UTR), IL10 (InDel en intrón 1) e IL10RA (InDel en exón 7). Además se decidió evaluar el marcador molecular microsatélite intergénico INRA111 (NC_030818.1: 40093864-40093818) debido a su asociación previa con el fenotipo de resistencia a tuberculosis bovina. Las regiones genómicas conteniendo los marcadores seleccionados se amplificaron mediante

PCR Multiplex y los polimorfismos se determinaron por electroforesis capilar. Finalmente, la asociación con el status serológico se evaluó a través del Test Exacto de Fisher. Para cada marcador molecular, se evaluó la variabilidad y posteriormente la asociación con el estatus serológico. Los marcadores INRA111 y TNF α mostraron variabilidad en las tres majadas analizadas y una asociación estadística significativa. El marcador MYD88-rs64 sólo presentó variabilidad en una de las majadas estudiadas sin significancia estadística, mientras que los otros marcadores moleculares evaluados no mostraron variabilidad en las poblaciones analizadas. En el caso del marcador TNF α , el alelo 369 (p= 0,042) y el genotipo 369 tanto en homo como en heterocigosis (p= 0,019) se encontraron asociados significativamente a la ausencia de anticuerpos anti-*Brucella*. Para el marcador INRA111, el genotipo 318/328 (p= 0,004) se encontró asociado a la ausencia de anticuerpos anti-*Brucella*, sugiriendo un efecto de ventaja del heterocigota. Estos resultados preliminares indicarían que determinados polimorfismos de los marcadores moleculares INRA111 y TNF α estarían asociados al fenotipo de resistencia a la infección por *Brucella* en caprinos. Esta asociación debe ser confirmada evaluando nuevas poblaciones caprinas de diversas zonas geográficas. De validarse estos resultados en futuros estudios, la selección genética podría considerarse como una herramienta complementaria en los programas de control y erradicación de la brucelosis en caprinos.

6D. SEROPREVALENCIA DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA EN RODEOS DEL CAMPESINADO DE LOS VALLES CALCHAQUÍES, SALTA

Larsen A.^{1,2,5}; Zapata F.J.³; Panei C.J.^{4,2}; Paredes M.J.^{5,6}; Cabrera A.⁵; Mattioli S.⁵; Unzaga J.M.⁵; Valera A.⁵; Pérez Escala S.⁵; Antón S.^{5,7}; Echeverría M.G.^{2,4}; Fontana P.⁵

¹ Laboratorio de Inmunología Veterinaria,

² LAVIR (FCV-UNLP),

³ Estudiante Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio,

⁴ CONICET,

⁵ Proyecto Caminando el Cerro, FCV-UNLP,

⁶ Becario UNLP.

⁷ AER INTA Seclantás.

*alelarsen@yahoo.es

La leucosis enzoótica bovina (LEB) enfermedad causada por el virus de la leucemia bovina (VLB) afecta a todos los bovinos independientemente de su raza, edad y sexo. A pesar de que existen algunos países libres de la enfermedad, en Argentina todavía existen establecimientos con altas prevalencias de LEB particularmente en rodeos lecheros. La transmisión viral puede ser vertical u horizontal, siendo la forma iatrogénica la más común, no obstante se ha demostrado la transmisión por diferentes vectores. De los animales infectados, menos del 5% desarrollarán linfoma (linfosarcoma), cerca de un 30% desarrollará una condición conocida como linfocitosis persistente, permaneciendo asintomáticos el resto de los animales infectados. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus de LEB en rodeos de cría, con mínima intervención zootécnica, para consumo propio de pequeños productores agrupados en organizaciones campesinas de 5 comunidades ubicadas en el Valle Calchaquí Norte, departamento de Molinos, Salta. El muestreo se realizó el día 25 de mayo de 2019, en ocasión de la campaña anual de vacunación contra la fiebre aftosa, en el marco del programa nacional, monitoreado por el AER INTA Seclantás y la asociación civil Red Valles de Altura. La obtención de 258 muestras de sangre fue realizada por grupos de profesores extensionistas y estudiantes participantes de la pasantía "Caminando el Cerro", proyecto de extensión de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de la Plata (FCV-UNLP). Para el diagnóstico serológico de LEB se utilizó la prueba de Inmunodifusión, según las especificaciones descriptas en el manual de

la OIE. El kit diagnóstico fue provisto por el Laboratorio de Virología FCV-UNLP, acreditado por SENASA para el diagnóstico oficial y la producción del kit. El procesamiento de los sueros fue llevado a cabo por estudiantes de la especialidad de diagnóstico de laboratorio veterinario de la facultad y participantes del proyecto de extensión ya mencionado. A la lectura de las placas resultaron positivos 3 sueros. Se realizó una segunda siembra de estos sueros enfrentados con 3 controles positivos para visualizar mejor las bandas de precipitado de aquellos débiles positivos, corroborando su resultado. Para la zona relevada se determina una prevalencia del 1,16%. Teniendo en cuenta el tipo de explotación extensiva, donde los animales son liberados al cerro y arreados 1 vez al año para vacunar y eventual faena, este resultado sorprende y amerita una anamnesis más exhaustiva para determinar el origen de la infección. Se postulan 3 posibles explicaciones para este resultado: 1- animales adquiridos de rodeos positivos; 2- el rodeo presenta la enfermedad con una prevalencia histórica muy baja con transmisión vertical que la perpetúa; 3- por último, la existencia de algún tipo de vector específico de la zona. Finalmente, se recomienda eliminar a los animales seropositivos, previa toma de muestras para diagnóstico serológico, molecular, secuenciación genómica y análisis de identidad. También es importante alertar sobre el riesgo de la vacunación con jeringa multidosis, debiendo tomar el recaudo de cambiar las agujas o en su defecto vacunar a los animales seropositivos al final con el objeto de evitar la transmisión iatrogénica.

SESIÓN ORAL: ENSEÑANZA DE LA INMUNOLOGÍA VETERINARIA

1E. LA ENSEÑANZA DE TEMAS DE NATURALEZA DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA Y EL DESARROLLO DEL PENSAMIENTO CRÍTICO EN INMUNOLOGÍA VETERINARIA: UN ESTUDIO DE CASO

Lampert D.^{1,2}; Larsen A.³; Unzaga J.³; Mórtola E.³; Porro S.²

¹ CONICET.

² Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

*Damian.lampert@gmail.com

La enseñanza de las ciencias, en carreras de salud y científico tecnológicas, se está modificando con la finalidad de incorporar contenidos de Naturaleza de la Ciencia y la Tecnología que permiten fomentar el pensamiento crítico del estudiantado. Este propósito de enseñanza bajo el enfoque Ciencia, Tecnología y Sociedad (CTS) propone fomentar una alfabetización científica y tecnológica al servicio de la ciudadanía sobre contenidos disciplinares que rondan en torno a la vida cotidiana. Tal es así que dentro del campo de las ciencias veterinarias y ciencia y tecnología de los alimentos se fueron realizando secuencias e intervenciones de enseñanza en diferentes niveles educativos. Trabajar los contenidos CTS dentro de la Inmunología Veterinaria permite incorporar aspectos sociales relevantes como la importancia de la vacunación de los animales para la salud pública, la toma de decisiones y resolución de problemas frente a la producción de vacunas, sueros y antígenos de diagnósticos, las controversias científicas frente a la vacunación y otros aspectos relacionados con la Sociología, Epistemología e Historia de la Inmunología. En este caso particular se propone una intervención didáctica dentro de la asignatura Inmunología Animal Aplicada del 5to año de la carrera de Ciencias Veterinarias de la UNLP con el objetivo de incorporar contenidos de Naturaleza de la Ciencia y la Tecnología y fomentar el desarrollo del Pensamiento crítico del estudiantado. La misma consistió en el diseño y la gestión de granjas educativas a partir de la incorporación de temas de Naturaleza de la Ciencia y la Tecnología como Problemas Sociales, y de resolución de problemas y toma de decisiones, dentro de la categoría del pensamiento crítico. La secuencia fue llevada a cabo a partir del análisis y la

mejora de modelos de granja. Se representaron escenarios de granjas educativas en las cuales se ubicaron animales, huertas, zonas de comedores a partir de juguetes con el objetivo de presentar un modelo de representación gráfica de la situación. De esta forma, el estudiantado tuvo que identificar los principales focos de infección de zoonosis, así como ciclos biológicos entre especies, y reestructurar la granja para disminuir o evitar el riesgo. En esta secuencia didáctica, se trabajaron contenidos de otras asignaturas bajo el enfoque didáctico de "Una salud". Para la evaluación de la propuesta se realizó un debate oral sobre un caso problema de mordedura de perro sospechoso de rabia. Asimismo, basándose en la metodología del proyecto CYTPENCRI¹, se realizó una encuesta al finalizar la intervención, en la cual el estudiantado debió valorar la secuencia didáctica con un puntaje de 1 a 4, siendo 4 el grado de mayor satisfacción, con respecto a si la secuencia didáctica les resultó interesante, motivacional, si les permitió desarrollar competencias críticas y, asimismo, aspectos sobre la duración y la dificultad de la misma. Se pueden destacar los siguientes valoraciones: el 66% del estudiantado indicó que la secuencia didáctica le permitió adquirir competencias científicas; al 92% le resultó útil lo aprendido; al 92% le resultó interesante lo aprendido; el grado de motivación fue aceptable para el 71% de las personas participantes y el 80% ha indicado que le permitió ser una persona más crítica. Estos resultados fueron acompañados con opiniones cualitativas del estudiantado, en las cuales resaltaron la aplicabilidad de un estudio de caso a los aspectos de salud pública, y el trabajo horizontal y vertical con otras asignaturas.

¹ CYTPENCRI - Educación de las competencias científica, tecnológica y pensamiento crítico mediante la enseñanza de temas de naturaleza de ciencia y tecnología-Proyecto EDU2015-64642-R (AEI/FEDER, UE) financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Proyecto del cual la Dra. Silvia Porro forma parte.

2E. TRABAJOS GRUPALES TUTORADOS COMO ESTRATEGIA PARA ESTUDIAR INMUNOLOGÍA EN SEGUNDO AÑO

Etcheverría A.I.¹; Gutiérrez S.E.¹; Estein S.M.¹; Lützel Schwab C.¹; Fernández D.¹; Fernández V.¹; Sanz M.E.¹; Arroyo G.H.¹; Padola N.L.¹; Lucchesi P.M.^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias - CIVETAN – CIC – CONICET - UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

*paulaluc@vet.unicen.edu.ar

El estudio y la comprensión de los componentes y mecanismos que integran el sistema inmunitario es un desafío para los alumnos que cursan segundo año. En la FCV-UNCPBA implementamos como estrategia de aprendizaje la realización y exposición de trabajos grupales por parte de los estudiantes, con la colaboración de un docente tutor. Con esta estrategia perseguimos como objetivos: estimular la participación activa de los estudiantes, promover el trabajo colaborativo grupal, incentivar su expresión oral y escrita, propiciar la integración de contenidos y orientarlos en el estudio de la asignatura. Cada trabajo grupal se realiza luego de la clase teórica guía del tema correspondiente. Para el trabajo se seleccionan conceptos/mecanismos relevantes y se elaboran 3 consignas o situaciones problema a resolver por los estudiantes. Los grupos, de 4 integrantes, se reúnen fuera del horario de clases para resolver las consignas, y cuentan con un docente tutor al que pueden consultar. Dada la limitada disponibilidad de tiempo por parte de los estudiantes, se exige una sola de las consignas para que trabaje cada grupo. La presentación escrita de cada trabajo tiene una extensión máxima de 2 carillas y se entrega luego en la clase práctica correspondiente. Las clases prácticas se desarrollan en comisiones de 30-40 estudiantes en las que

se seleccionan 3 grupos para realizar la presentación oral del trabajo (un grupo por consigna). Cada comisión está a cargo de 2 docentes que guían el desarrollo del TP, incentivan la realización de esquemas para apoyar la explicación, guían para la corrección de errores, proponen nuevas situaciones a discutir en el momento, además de fomentar el aporte de otros grupos. Se registra el desempeño grupal tanto en la exposición oral como en el informe escrito. A partir de la realización de esta actividad hemos observado que la elaboración de esquemas por parte de los estudiantes les facilita la comprensión de distintos componentes y mecanismos inmunitarios, y las relaciones entre ellos. Esta estrategia de trabajo grupal tuvo buena aceptación y fue valorada positivamente por la mayoría de los estudiantes. Consideramos que permite lograr los objetivos propuestos e incentiva a los estudiantes a llevar la asignatura al día. La participación de los tutores cumple un rol importante dado que les ofrece ámbitos reducidos para hacer sus consultas lo cual fomenta una mayor interacción y permite a los docentes detectar dificultades en la comprensión de ciertos temas que luego pueden ser reforzados durante las clases prácticas.

3E. UTILIZACIÓN DE CASOS CLÍNICOS PARA LA ENSEÑANZA DE LAS INMUNOPATOLOGÍAS DURANTE EL CURSO DE INMUNOLOGÍA ESPECIAL

Fernández Fellenz D.^{1*}; Etcheverría A.I.¹; Estein S.M.¹; Fernández V.¹; Sanz M.E.¹; Padola N.L.¹

¹ CIVETAN, CONICET, CIC. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil. Buenos Aires.

*dfer_inm@vet.unicen.edu.ar

El curso de Inmunología Especial es bimestral y se dicta en el primer cuatrimestre del 4° año de la Carrera de Ciencias Veterinarias, en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, en la ciudad de Tandil. Consta de clases teóricas en las cuales se abarcan temas como hipersensibilidad tipo I, II, III y IV, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, inmunidad contra los tumores e inmunoprevención. Además, los alumnos trabajan en talleres, en grupos, resolviendo casos clínicos que involucran a las inmunopatologías más comunes en grandes y pequeños animales. Cada caso clínico presentado posee los aspectos clave para su resolución: anamnesis del animal y los signos y síntomas que presenta el mismo. Durante la resolución del caso, los alumnos deben relacionar los datos aportados por el docente con el mecanismo inmunitario correspondiente. Además, pueden solicitar los resultados de las pruebas complementarias realizadas por el profesional actuante, y de este modo interpretar los resultados aplicando el criterio

profesional. Luego, los alumnos realizan una exposición oral con la consiguiente discusión entre los grupos y con la intervención y guía de los docentes. Esta modalidad de resolución de casos también fue utilizada para la evaluación en instancias de exámenes parciales escritos y finales orales. Se observaron varias ventajas frente a la modalidad utilizada en años anteriores en los cuales se realizaban preguntas conceptuales sobre las temáticas desarrolladas en clases teóricas. Entre estas ventajas pueden mencionarse mayor participación, interacción e interés de los alumnos en la resolución de los casos, discusión entre los grupos que presentaban casos clínicos diferentes, y además, el desarrollo de un algoritmo diagnóstico útil para el ejercicio futuro de la profesión. Consideramos que esta forma de enseñanza de entrenamiento con casos clínicos brinda importantes ventajas y herramientas que serán de utilidad para el alumno en los próximos años de la Carrera de Ciencias Veterinarias.