



XVI Jornadas Anuales de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria 2025

Simposio Latinoamericano de Inmunología Veterinaria

IV Reunión de la Red Latinoamericana de Inmunología Veterinaria

IV Latin American Symposium of Veterinary Immunology in La Estanzuela, Colonia, Uruguay from 19th to 21st November, 2025.

Colaboración sin fronteras en inmunología veterinaria Latinoamericana
Collaboration without borders in Veterinary Immunology in Latin
America

LIBRO DE RESÚMENES

ORGANIZADORES



Sponsors platino



Sponsors Oro



Agencias Financiadoras



COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. Alejandra Capozzo (UAI, Argentina)

Dra. Silvia Colavechia (FCV- UBA, Argentina)

Dra. Teresa Freire (UdelaR, Uruguay)

Dr. Federico Gianitti (INIA, Uruguay)

Dr. José Angel Gutiérrez Pabello (UNAM, México)

Dr. Jesús Hernández (CIAD, México)

Dr. Rodrigo Puentes (UdelaR, Uruguay)

Dra. Florencia Rammauro (UdelaR, Uruguay)

Dra. Adriana Soutullo (UNL, Argentina)

Dr. Kevin Yaneselli (UdelaR, Uruguay)

Dr. Eduardo Mortola (UNLP, Argentina)

Dra. Carolina Velez (UNLPAM, Argentina)

Dra. Carina Porporatto (UNVM, Argentina)

Dra. María Sol Renna (UNL, Argentina)

Dra. Antonela Stassi (UNL, Argentina)

PROGRAMA

Miércoles 19/11/25:

8:00-12:00: **Acreditación**

8:30-9:00: Acto de apertura a cargo de las autoridades de INIA AAIV y RedLatInVet.

Ing. Agr. Dr. Rodrigo Zarza, Director Regional de INIA.

Dra. Alejandra Capozzo, Presidente Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria.

9:00-10:00: **Conferencia Inaugural.**

Facundo Batista (Harvard Medical School, USA). Título: *Desarrollo de modelos murinos preclínicos para acelerar las vacunas y biológicos de próxima generación.*

10:00-10:30: Intervalo. Coffee break. (incluido)

10:30-12:30: **Mesa redonda: Inmunología Veterinaria en Infecciones virales**

Bailey Arruda (Research Veterinary Medical Officer, USDA National Animal Disease Center, Ames, Iowa). Título: Combatiendo la compleja ecología del virus de influenza aviar altamente patógeno: de la inoculación a la aplicación en bovinos lecheros lactantes.

Fernando Nogueira Souza (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Sao Paulo, Brasil). Título: Más allá del cáncer: desbloqueando el potencial de los inhibidores de puntos de control para enfermedades virales.

María Montoya (Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid, España). Título: *Interacciones del virus de la gripe porcina con el sistema inmunitario del cerdo: nuevas perspectivas y lecciones para el diseño de vacunas.*

12:30-12:45: Presentación de Virbac 13:00-14:00: Almuerzo (incluido)

14:00-16:00: Presentaciones cortas seleccionadas

Área temática: Diagnóstico inmunológico

- 14:00-14:10: Mauro Manfredi. Título: Generación de suero hiperinmune frente a *Rhodococcus equi* utilizando proteína recombinante VapA como inmunógeno.
- 14:10-14:20: Julio César Tobón Torreglosa. Título: Indicadores Epidemiológicos y Socioeconómicos de la Leucosis Bovina Enzoótica en Colombia.
- 14:20-14:30: Hernán Alvarez. Título: Desarrollo y validación preliminar de un ELISA recombinante para el diagnóstico de *Babesia bovis*.

Área temática: Respuesta inmune a infecciones

- 14:30-14:40: Luis M. Jara. Título: Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral a *nivel local y sistémico en perros inmunizados experimentalmente contra Echinococcus granulosus*.
- 14:40-14:50: Conrado Rodríguez Raineri. Título: Impact of *Fasciola hepatica* infection on the antibody response to foot-and mouth disease vaccination in cattle.
- 14:50-15:00: Flores Villalva, Susana. Título: Perfil inmunológico comparativo de LIs respuestas de linfocitos T CD4⁺ hacia la tuberculosis bovina en búfalos y bovinos.

Área temática: Inmunointervención y Vacunas

- 15:00-15:10: Maria Sol Rodríguez. Título: Una nueva estrategia biotecnológica basada en insectos para optimizar el tratamiento veterinario de animales de compañía mediante citoquinas especie-específicas.
- 15:10-15:20: Guillermo Esteban Meglia. Título: Persistencia de la inmunidad adquirida contra brucelosis en cabras.
- 15:20-15:30: Analía Rial. Título: Evaluación comparativa de la respuesta inmune inducida por vacunas atenuadas.

Área temática: Otros

- 15:30-15:40: Valeria Silva-Álvarez. Título: Adaptaciones metabólicas del esturión ruso frente a la infección bacteriana y al estrés térmico crónico.
- 15:40-15:50: Julio César Tobón Torreglosa. Título: Impacto de los factores socioeconómicos de los pequeños productores en sus fincas.

- 16:00-18:00: Presentación de pósters 1 al 21 18:00-18:30. Intervalo. Coffee break (incluido)
- 18:30-19:30: **Conferencia plenaria**
- Brad Hine (CSIRO, Australia). Título: Selección por competencia inmunológica en animales de granja

Jueves 20/11/25:

- 8:00-9:00: Acreditación
- 8:30-9:30: **Conferencia plenaria**
- Dirk Werling (Royal Veterinary College, Londres, UK). Título: Plataformas de órganos en inmunología veterinaria.
- 9:30-10:00. Intervalo. Coffee break. (incluido)
- 10:00-12:00: **Mesa redonda: Inmunología Veterinaria en infecciones bacterianas**
- Mariela Segura (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Canada). Título: Una vacuna glicoconjugada de nueva generación contra el patógeno porcino y zoonótico *Streptococcus suis*.
- Eduardo Cobo (University of Calgary, Canada). Título: "Inmunidad innata en colitis bacterianas: modelos de *Brachyspira hyodysenteriae* en cerdos y *Citrobacter rodentium* en ratones".
- Catalina Picasso (Universidad de la República, Uruguay y Michigan State University, USA). Título: "Optimización del diagnóstico de tuberculosis bovina: un enfoque basado en el estado inmunológico del huésped". VIRTUAL.
- 12:00-13:00: Almuerzo (incluido)
- 13:00-15:00: Presentaciones cortas seleccionadas
- Área temática: Inmunointervención y Vacunas
- 13:00-13:10: José Rodrigo Morales García. Título: Diseño de una proteína quimérica basada en epítomos B conservados e inmunogénicos de distintas regiones de México, de tejidos de intestino, ovario y glándula salival de *R. microplus*.
- 13:10-13:20: Maritza Alejandra Cordero Ortiz. Título: Production and isolation of monoclonal

porcine antibodies against the influenza virus from single B cells.

- 13:20-13:30: Alma Cárdenas-Flores. Título: Diseño y expresión de una proteína recombinante multi-antigénica y multi-epitópica como candidato vacunal contra la babesiosis bovina causada por *Babesia bovis*.
- 13:30-13:40: Marcelo Gottschalk. Título: Ausencia de interferencia de los anticuerpos maternos en la respuesta inmune de lechones jóvenes vacunados con una bacteria de *Streptococcus suis* serotipo 2.
- 13:40-13:50: Belkys A. Maletto. Título: Nueva estrategia de vacuna a subunidad contra la coriza infecciosa en pollos.
- 13:50-14:00: Laura de Urbina Fuentes. Desarrollo de una vacuna de ARN mensajero frente a la leishmaniosis canina.
- 14:00-14:10: Clara Hurtado Morillas. Título: Nanovacunas en veterinaria: seguridad e inmunogenicidad de HisDTC frente a *Leishmania infantum* en un ensayo clínico en perros.
- 14:10-14:20: Pedro Fernández Rodríguez. Título: Diseño *in silico* de una vacuna multiepitópica de ARNm frente a *Ehrlichia canis* mediante herramientas de inmunoinformática.
- 14:20-14:30: Juan Mosqueda. Título: Evaluación de la inmunogenicidad y seguridad de una vacuna recombinante multi-epitópica contra la enfermedad hemorrágica viral del conejo tipo 2 (RHDV2).
- 14:30-14:40: Monique Costa. Título: Recombinant non-native fusion protein for active immunization against Nerve Growth Factor and Substance P to treat chronic inflammatory pain in dogs.
- 14:40-14:50: Cecilia Camussone. Título: Liposomas catiónicos suplementados con ADN plasmídico como inmunoestimulante bovino.
- 15:00-17:00: Presentación de pósteres 22 al 42 17:00-17:30. Intervalo. Coffee break. (incluido)
- 17:30-19:30: **Mesa redonda: Vacunas I**
- Jeffrey Chen (Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan's, Canada). Título: Hacia una nueva vacuna contra la tuberculosis bovina: desafíos y oportunidades.
- Karina Trono (Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas-CONICET, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Argentina). Título: Cómo avanza el desarrollo de la vacuna contra la leucosis bovina.

Federico Blanco (INTA-CONICET y Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, Argentina). Título: Nuevas estrategias vacunales para el control de la tuberculosis bovina.

19:30-20:30: Reunión/Asamblea de la AAIV y de la RedLatInVet

Viernes 21/11/25:

8:00-9:00: Acreditación

8:30-10:30: **Mesa redonda: Vacunas II**

Francisco Salguero (United Kingdom Health Security Agency, Porton Down, Salisbury, UK). Título: Evaluación preclínica de vacunas frente a patógenos intracelulares utilizando *Multiplex imaging* y transcriptómica espacial".

Hiep Vu (University of Nebraska-Lincoln, Nebraska, USA). Título: Vacunas veterinarias de nueva generación: la búsqueda de plataformas *plug-and-play*.

Itabajara Vaz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil). Título: Vacunas contra garrapatas: resultados, avances y perspectivas.

10:30-12:30: **Mesa redonda Uso de Inteligencia Artificial en docencia**

Alejandro Stratchan (Reilly Professor of Materials Engineering, Purdue University Research Fellow for Intelligent Twins and Digital Innovation, Purdue University Co-Director, nanohub.org and chipshub.org). Título: NanoHUB: IA en educación y educación en IA.

Hernán Hermida (Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina). Título: Prototipo de herramienta basada en Inteligencia Artificial aplicada en la enseñanza de Inmunología Veterinaria.

Fabiana Grinsztajn (Directora CEDU Especialización en Docencia Universitaria, Coordinadora Innovación Curricular y Planeamiento Estratégico Secretaría Académica FCV - UBA, Argentina) Título: Desafíos de la Inteligencia Artificial Generativa en la enseñanza veterinaria.

12:30-13:00. Intervalo. Coffee break. (incluído)

13:00-14:00: **Conferencia de clausura y ceremonia de cierre**

Luis Miguel Ortega-Mora (Universidad Complutense de Madrid, España):
Título: Desarrollo de vacunas contra protozoos causantes de fallas reproductivas en rumiantes.

16:00-18:00: Tour ciudad de Colonia.

Inscripciones: <https://forms.gle/8zRHhVFJqDN6YuaYA>

LIBRO DE RESÚMENES

Miércoles 19/11/25

14:00-16:00: PRESENTACIONES CORTAS

| | |
|---|-----|
| <i>Diagnóstico Inmunológico e Inmunología Clínica</i> | 185 |
| <i>Respuesta Inmune en Infecciones</i> | 188 |

Jueves 20/11/25

13:00-15:00: PRESENTACIONES CORTAS

| | |
|--------------------------------------|-----|
| <i>Inmunointervención y Vacunas</i> | 191 |
| <i>Otros</i> | 194 |
| <i>Inmunointervención en Vacunas</i> | 196 |

PRESENTACIÓN DE PÓSTERES

| | |
|---|-----|
| <i>Respuesta Inmune en Infecciones</i> | 206 |
| <i>Diagnóstico Inmunológico</i> | 217 |
| <i>Inmunointervención y Vacunas</i> | 227 |
| <i>Enseñanza de Inmunología Veterinaria</i> | 235 |
| <i>Otros</i> | 236 |

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

GENERACIÓN DE SUERO HIPERINMUNE FRENTE A *RHODOCOCCLUS EQUI* UTILIZANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE VAP A COMO INMUNÓGENO

GENERATION OF HYPERIMMUNE SERUM AGAINST *RHODOCOCCLUS EQUI* USING RECOMBINANT VAP A PROTEIN AS AN IMMUNOGEN

Larsen, A^{*1,2}; Barragán, J⁴; Soriano, M³; Mucci, N³; *Manfredi, M^{1,2}; Salina, M^{1,2}; Sguazza, H^{1,2}; Sanz, M⁵; y Mortola, E.^{1,2}

¹Laboratorio de Inmunología Veterinaria.

²CEMIBA (Centro de Microbiología Básica y Aplicada) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³Clonargen Biotech, Lujan, Buenos Aires, Argentina.

⁴Catedra Inmunología 2ª parte, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁵Iowa State University, Ames, IA.

*alelarsen@fcv.unlp.edu.ar

Rhodococcus equi es la principal causa de neumonía en potrillos de entre 3 semanas y 5 meses de edad, representando un desafío significativo para la salud equina. Dado que aún no se ha desarrollado una vacuna efectiva, el uso de sueros hiperinmunes anti-*R. equi* (SHI-*R. equi*) constituye el método de profilaxis de elección en los establecimientos. Solo cepas de *R. equi* que expresan la proteína VapA son virulentas en potrillos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un SHI-*R. equi* incorporando una proteína recombinante VapA (*rVapA*) en la formulación del inóculo, con el fin de potenciar la inmunidad específica. Para ello, se evaluó la respuesta inmunitaria en cinco equinos inmunizados bajo un esquema escalonado de tres dosis administradas a intervalos de 21 días. Cuatro de los animales recibieron una suspensión de *R. equi* virulento inactivado en concentración vacunal, mientras que el quinto fue inmunizado con *rVapA*. En todas las formulaciones se utilizó adyuvante completo

e incompleto de Freund. Las muestras de sangre para serología anti-*R. equi* se recolectaron desde el inicio de la experiencia, semanalmente durante 28 días y se analizaron mediante inmunodifusión radial (IDR), utilizando controles con títulos de 1:10.240, 1:20.480 y 1:40.960, presentando halos de 3, 6 y 8 mm respectivamente. Al día 28 post-inmunización, todos los animales alcanzaron títulos iguales o superiores a 1:20.480, y dos de ellos — incluido el inmunizado con *rVapA* — superaron el valor de 1:40.960, evidenciando una respuesta serológica robusta y compatible con un estado de hiperinmunidad. Estos resultados sugieren que la formulación con *rVapA* como inmunógeno indujo una respuesta vacuna comercial como inóculo que generan respuestas variables. El esquema permitió obtener altos títulos serológicos y la IDR resultó útil para su titulación, planteando una alternativa controlada, reproducible y específica frente a *R. equi*.

INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS Y SOCIOECONÓMICOS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN COLOMBIA.

EPIDEMIOLOGICAL AND SOCIOECONOMIC INDICATORS OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS IN COLOMBIA

Tobón JC*; Luque PA

Empresa Colombiana de Productos Veterinarios – VECOL S.A.; Bogotá - Colombia

*julio.tobon@vecol.com.co

La ganadería en Latinoamérica es vital para la seguridad alimentaria, pero enfrenta desafíos por enfermedades como la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE). En Colombia, donde la mayoría de los productores son pequeños, el desconocimiento de la LBE dificulta las medidas de control y prevención, este estudio buscó determinantes de la LBE y sus implicaciones económicas en producciones de ganado doble propósito en 26 municipios, un sistema de producción poco explorado. Para lograr este objetivo, se analizaron 17.108 muestras a través de pruebas serológicas y se tomaron 20 muestras para PCR. Además, se aplicaron encuestas epidemiológicas y socioeconómicas para entender el estatus sanitario, los factores de riesgo y el impacto económico de la enfermedad. Con toda esta información, se pudo determinar la correlación de LBE con la producción de leche y carne, y proponer un plan de prevención y control. La prevalencia de la enfermedad fue

del 39,3 % en los animales y 86 % en los predios, siendo las hembras bovinas y animales mayores de tres años los más afectados. Un hallazgo importante fue que el uso de baños con cipermetrina se identificó como un factor de riesgo, relacionado con la presencia de vectores. El 82 % de los ganaderos son pequeños productores, lo que dificulta la implementación de medidas de erradicación como el sacrificio. En cuanto a implicaciones económicas, LBE afecta la rentabilidad al disminuir la producción de leche en un 1,5 % por vaca al año. Los datos socioeconómicos revelaron que los productores rurales desconocen la enfermedad y sus medidas preventivas, lo que los lleva a invertir en tratamientos ineficaces. Este estudio ofreció herramientas valiosas para educar a los productores y plantea una línea base para la formulación de políticas que promuevan la medicina preventiva, lo que es esencial para la sostenibilidad y rentabilidad de la ganadería bovina en el país.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN PRELIMINAR DE UN ELISA RECOMBINANTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE *BABESIA BOVIS*

DEVELOPMENT AND PRELIMINARY VALIDATION OF A RECOMBINANT ELISA FOR THE DIAGNOSIS OF *BABESIA BOVIS*

Álvarez H.¹, Guarnaschelli J.¹, Parodi P.², Menchaca A.³, Chabalgoity J. A.¹, Rossi A.^{*1}

¹ Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

² Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA Tacuarembó, Uruguay.

³ Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

*arossi@higiene.edu.uy

Babesia bovis es un protozooario hemoparásito transmitido por la garrapata *Rhipicephalus microplus*, agente causal de la babesiosis bovina. Esta enfermedad, altamente letal, afecta al ganado ocasionando importantes pérdidas económicas globales. Uruguay, ha reportado un aumento en la incidencia de babesiosis, asociado a la expansión geográfica de la garrapata, generando pérdidas de 15 millones de dólares anuales en los sistemas productivos de carne y leche. El control efectivo de la babesiosis requiere un manejo adecuado del ganado, control de garrapatas, vigilancia epidemiológica y vacunación. Para una vigilancia epidemiológica eficiente es indispensable disponer de herramientas serodiagnósticas confiables, que determinen el estado de estabilidad enzoótica de los rebaños e identifiquen aquellos con riesgo de brotes epizooticos. El diagnóstico de *B. bovis* en Uruguay se basa en inmunofluorescencia indirecta, cuyas limitaciones han impulsado la búsqueda de métodos alternativos más sensibles, específicos y de mayor capacidad de procesamiento. Este trabajo se

propuso desarrollar un ELISA específico contra *B. bovis* empleando un antígeno recombinante. Como candidato seleccionamos la proteína-1 asociada a la roptra (RAP-1). El extremo C-terminal de RAP-1 (rCt-RAP-1_Bbo fue clonado, expresado soluble en *E. coli* y purificado por afinidad. Para la optimización del ELISA se utilizaron sueros de bovinos positivos y negativos para *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*. La antigenicidad de rCt-RAP-1_Bbo fue confirmada mediante inmunoblot. Los resultados preliminares mostraron que rCt-RAP-1_Bbo fue reconocida por sueros positivos (7/10), mientras que 2/10 sueros negativos presentaron títulos elevados frente a *B. bovis*. No se detectó reactividad cruzada con *B. bigemina* ni con *A. marginale*. Con sueros negativos (n=50) se determinó un valor de corte que permitirá diferenciar animales seropositivos de seronegativos. Nuestros resultados demuestran la factibilidad de producir y validar un antígeno recombinante con potencial diagnóstico frente a *B. bovis*, cuya implementación fortalecería las capacidades diagnósticas nacionales.

RESPUESTA INMUNE EN INFECCIONES

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO EN PERROS INMUNIZADOS EXPERIMENTALMENTE CONTRA *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

EVALUATION OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE AT LOCAL AND SYSTEMIC IN DOGS EXPERIMENTALLY IMMUNIZED AGAINST *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

Jara L. M.^{1*}, Rodríguez M.², Sánchez L.³, Dávila D.³, Celiz H.⁴, Herrera A.⁵, Altamirano F.⁵, Mamani J.¹, Verástegui M.³, Gavidia C. M.⁵

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

² BELOMED, Lima, Perú.

³ Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

⁴ Instituto Nacional de Innovación Agraria, Perú.

⁵ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

*luis.jara.s@upch.pe

La equinococosis quística es una zoonosis causada por el céstodo *Echinococcus granulosus*. La interrupción del ciclo biológico mediante una vacuna en el hospedero definitivo es una alternativa costo-efectiva para prevenir la infección en los hospederos intermediarios. El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta inmune celular y humoral a nivel local y sistémico en perros inmunizados experimentalmente frente a *E. granulosus*. Se inmunizaron perros con proteínas secretoria/excretoria y soluble del parásito adulto y protoescolices. Todos los animales inmunizados (n=6) y no inmunizados (n=6) fueron posteriormente desafiados, a excepción de un grupo control (n=3) que se incluyó sin inmunizar y desafiar. Se determinaron los niveles de inmunoglobulinas séricas G, M y E, e inmunoglobulina A fecal anti-*E. granulosus* mediante ELISA indirecto. Además, se determinó la expresión relativa de citoquinas Th1 (IL-2, INF- γ , TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17) y T regulatoria (IL-10, TGF- β) en células mononucleares de sangre periférica, mucosa intestinal y

ganglio linfático mesentérico mediante PCR transcriptasa inversa en tiempo real. Se midió también la reactividad de mastocitos e inmunoreactividad de eosinófilos, linfocitos T CD3, CD4, y linfocitos B en mucosa intestinal y ganglio linfático mesentérico mediante inmunohistoquímica. La inmunización redujo en 79,5 % la carga parasitaria. El incremento de IgG e IgA anti-protoescolices de *E. granulosus* fue significativamente mayor en los animales inmunizados a partir de los 7 días post-desafío. La expresión relativa de IL-5 en mucosa intestinal en los animales inmunizados fue significativamente mayor además de una tendencia en la IL-13. Además, la IL-13, TGF- β , INF- γ y TNF- α fueron mayores a nivel sistémico en los primeros días post-desafío. Asimismo, la inmunización produjo significativamente una mayor inmunoreactividad de linfocitos T en placas de Peyer y nódulo linfático mesentérico, linfocitos B y eosinófilos en nódulo linfático mesentérico, y una tendencia de mastocitos en las criptas de Lieberkühn intestinal.

ROL DE LA INMUNOMODULACIÓN EJERCIDA POR *FASCIOLA HEPATICA* EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE A LA VACUNA ANTIAFTOSA EN BOVINOS.

ROLE OF IMMUNOMODULATION EXERTED BY *FASCIOLA HEPATICA* IN THE DEVELOPMENT OF THE IMMUNE RESPONSE TO THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VACCINE IN CATTLE.

Rodríguez, C.^{1*}; Parodi, P.¹; Menchaca, A.¹; Saravia, A.¹; Wilda, M.¹; Capozzo, A.²; Freire, T.¹.

¹Facultad de Medicina, Udelar, Montevideo, Uruguay. Plataforma de Investigación en Salud Animal. INIA-Uruguay, Uruguay.

²Centro de altos estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina.

*crodriguezraineri@gmail.com

Fasciola hepatica is known to have a strong effect on the host's immune system, potentially making the animal more susceptible to other diseases. While vaccination is a highly effective tool for controlling Foot and Mouth Disease (FMD) in cattle, the effect of an existing *F. hepatica* infection on the immune response to the FMD vaccine has been slightly documented. Our objective was to evaluate whether the infection by *F. hepatica* in cattle influences the long-term immunity stimulated by the currently used commercial FMD-inactivated vaccines, and the ability of an anthelmintic to prevent immunomodulation by the parasite. The experiment was conducted from June 2024 until March 2025. Fifty-two calves from 6 to 8 months old were allocated in the different treatments indicated as follows: infected before vaccination (INF1, n=11), infected and treated with

triclabendazole (TCZ) before vaccination (INF1T, n=11), infected after vaccination (INF2, n=10), infected and treated with triclabendazole after vaccination (INF2T, n=10), and only vaccinated (CON, n=10). All groups received a booster with the FMD vaccine 5 months after the first vaccination. Biological samples (blood and fecal matter) were collected every 2 weeks. The avidity of IgG1 FMDV-specific antibodies at day 28 after booster in the INF2 group was reduced compared to the others. These results indicate that active *F. hepatica* infection at the time of recall response diminishes antibody avidity without affecting total titers, thereby compromising vaccine-induced memory responses. Importantly, TBZ treatment prevented this effect, highlighting the relevance of parasite management for sustaining vaccine efficacy in endemic settings.

PERFIL INMUNOLÓGICO COMPARATIVO DE LAS RESPUESTAS DE LINFOCITOS T CD4⁺ EN BÚFALOS Y BOVINOS NATURALMENTE EXPUESTOS A *MYCOBACTERIUM BOVIS*

COMPARATIVE IMMUNOLOGICAL PROFILING OF CD4⁺ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN BUFFALOES AND CATTLE NATURALLY EXPOSED TO *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Flores-Villalva S.¹, De Matteis G.², Grandoni F.², Scatà M.C.², Donniacuo A.³, Schiavo L.³, Franzoni G.⁴, Mazzone P.⁵, Elnaggar M.⁶, De Carlo E.³, Galiero G.³, Davis W.C.⁷, Martucciello A.³

¹ CENID Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Mexico City, Mexico.

² Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, CREA-Animal Production and Aquaculture, Monterotondo, Italy.

³ National Reference Centre for Hygiene and Technologies of Water Buffalo Farming and Productions, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Salerno, Italy.

⁴ Department of Animal Health, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italy.

⁵ Centro Specialistico di Ricerca Applicata alle Micobatteriosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy.

⁶ Department of Veterinary Medicine, College of Applied and Health Sciences, A'Sharqiyah University, Ibra, Oman.

⁷ Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, USA.

*giovanna.dematteis@crea.gov.it

La tuberculosis bovina causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), es una enfermedad con importantes implicaciones zoonóticas y económicas que afecta diversas especies. Aunque bovinos y búfalos pertenecen a la familia *Bovidae*, sus respuestas inmunitarias frente a patógenos pueden diferir, y el conocimiento sobre la inmunidad de los búfalos hacia *M. bovis* sigue siendo limitado. El objetivo de este estudio fue comparar linfocitos T CD4⁺ productores de citocinas específicos a *M. bovis* en búfalos y bovinos utilizando citometría de flujo multicolor. Se analizaron muestras sanguíneas de 35 búfalos y 10 bovinos, clasificados según los resultados de la prueba de liberación de interferón gamma (IGRA) y el estatus sanitario del hato. Los búfalos se dividieron en 17 animales IGRA-positivos de hatos con brotes confirmados, y 18 IGRA-negativos, 13 procedentes de hatos con brotes y 5 de hatos oficialmente libres de tuberculosis (OTF). Los bovinos incluyeron seis IGRA-positivos de un hato con brote y cuatro IGRA-negativos de

un hato OTF. Las muestras de sangre fueron estimuladas *in vitro* durante seis horas con derivado proteico purificado bovino (PPD-B) o PBS, y posteriormente sometidas a tinción intracelular para realizar un análisis unicelular de alta resolución de IFN- γ , TNF- α e IL-17A. Los datos se procesaron mediante análisis factorial de datos mixtos (FAMD) para identificar patrones inmunitarios asociados a la especie y estado de infección. Aunque el FAMD reveló cierta superposición entre especie, los subconjuntos de células T CD4⁺ IL-17A⁺, IFN- γ IL-17A⁺ y TNF- α IL-17A⁺ contribuyeron a la diferenciación entre especies. Además, las poblaciones productoras de IFN- γ y TNF- α se asociaron con el estatus IGRA, distinguiendo animales infectados/expuestos y controles. En conclusión, búfalos y bovinos presentaron perfiles inmunitarios comparables con diferencias sutiles entre especies. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la inmunidad en búfalos y apoyan el uso de la citometría de flujo multicolor en inmunología veterinaria comparada

INMUNOINTERVENCIÓN Y VACUNAS

UNA NUEVA ESTRATEGIA BIOTECNOLÓGICA BASADA EN INSECTOS PARA OPTIMIZAR EL TRATAMIENTO VETERINARIO DE ANIMALES DE COMPAÑÍA MEDIANTE CITOQUINAS ESPECIE-ESPECÍFICAS

A NEW INSECT-BASED BIOTECHNOLOGY STRATEGY TO OPTIMIZE VETERINARY TREATMENT OF COMPANION ANIMALS USING SPECIES-SPECIFIC CYTOKINES

Rodriguez MS^{*1,2}, Smith I^{1,3}, Targovnik AM^{1,2}, Miranda MV^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y Genética, Cátedra de Biotecnología. Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

² CONICET- Universidad de Buenos Aires. Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC). Buenos Aires, Argentina.

³ Trebe Biotech SRL, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

*solrodriguez.2098@gmail.com

Los interferones (IFNs) son citoquinas esenciales del sistema inmune innato, con aplicaciones en medicina veterinaria por su actividad antiviral y antitumoral. Actualmente, las terapias frente a virosis en animales de compañía suelen recurrir a IFNs humanos, cuya eficacia se ve limitada por la generación de anticuerpos neutralizantes. Existen en el mercado productos veterinarios específicos, como el interferón recombinante omega felino (rFeIFN ω), Virbagen Omega® y el interferón recombinante gamma canino (rCaIFN γ), Interdog™, pero su disponibilidad está restringida a países de Europa y Asia. En este trabajo presentamos una plataforma biotecnológica basada en larvas de insecto *Rachiplusia nu* para la producción de IFNs especie-específicos: rCaIFN α , rCaIFN β y rFeIFN ω . Los rIFNs purificados alcanzaron elevada pureza, mostraron el peso molecular esperado (23 kDa) y correcta glicosilación, confirmados mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-6xHis. La cuantificación de proteínas se realizó mediante Bradford y la actividad biológica se evaluó *in vitro*. La actividad antiviral frente al virus de la estomatitis

vesicular (VSV) se analizó en células *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) y *Crandell-Rees Feline Kidney* (CRFK), observándose mayor eficacia de los IFNs especie-específicos en líneas homólogas. Los rendimientos fueron de $6,75 \times 10^6$ UA/g (rCaIFN α), $3,99 \times 10^5$ UA/g (rCaIFN β) y $1,6 \times 10^3$ UA/g (rFeIFN ω). Además, los rCaIFNs mostraron actividad antitumoral en un ensayo independiente sobre células de melanoma canino. El rFeIFN ω comercial no presentó eficacia antiviral ni antiproliferativa en células caninas, reforzando la necesidad de terapias adaptadas a cada especie. El proceso, optimizado y escalable mediante un único paso cromatográfico, fue transferido a Trebe Biotech (Pergamino, Buenos Aires), constituyendo un hito en la articulación entre ciencia y desarrollo industrial. Actualmente se realizan estudios de toxicidad y estabilidad, con el objetivo de avanzar hacia su validación preclínica. Esta plataforma constituye una alternativa estratégica a productos importados y una oportunidad para ofrecer inmunomoduladores seguros, accesibles e innovadores con impacto regional.

PERSISTENCIA DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA CONTRA BRUCELOSIS EN CABRAS

PERSISTENCE OF ACQUIRE IMMUNITY AGAINST BRUCELLOSIS IN GOATS

Meglia, GE.^{1*}; Castillo, M.¹; Gastaldo, MF.¹; Cerutti, DA.¹; Palermo, PV.¹; Aab, B.¹; Tortone, C.²; Portu, AI.²; Elena, S.³; Bonastre, P.³; Fabeiro, M.³; Alonso, B.³ y Bagnat, E.³

¹ Cátedra de Inmunología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., General Pico, La Pampa, Argentina.

² Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., General Pico, La Pampa, Argentina.

³ Laboratorio Central Martínez, Dirección de Brucelosis, Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), Martínez, Buenos Aires, Argentina.

*gmeglia@vet.unlpam.edu.ar

La brucelosis caprina es una enfermedad infecciosa, zoonótica y endémica en el noroeste argentino. La cepa vacunal Rev-1 de *Brucella melitensis* se indica en hembras prepúberes para prevención de la enfermedad en ovinos y caprinos, aunque, en estos últimos se desconoce la duración de la inmunidad. El objetivo del trabajo fue determinar la memoria inmunológica en cabras adultas luego de aplicar dos protocolos de vacunación en etapa de cabrillonas. En 2020, se vacunaron dos grupos: el Amarillo, en pre-servicio y nuevamente entre los 70–90 días de gestación, y el Rojo en el mismo estadio gestacional. En 2024 seis cabras de cada grupo y un nuevo grupo (control, Verde) de siete cabrillonas negativas a brucelosis, fueron desafiados por vía conjuntival con la cepa vacunal, entre los 70–90 días de gestación. Se muestrearon periódicamente (sangre, secreciones y tejidos). Los grupos Amarillo y Rojo parieron a término

crías viables, sin diferencias entre ellos, pero sí con el grupo Verde ($p < 0,05$) que abortó entre los 30–45 días post-inoculación y del cual, se aisló la cepa vacunal en leche, mucus vaginal, y en los fetos en hígado, bazo y líquido abomasal. Los títulos de anticuerpos presentaron diferencias entre los grupos, siendo el de menor título el Amarillo, seguido por el Rojo y el Verde. También, las concentraciones de inmunoglobulinas difieren en el tiempo de muestreo, registrando el menor título en pre-servicio, e incrementándose significativamente ($p < 0,05$) hasta los 60 días post aborto/parto y manteniéndose hasta los 180 días después de la parición cuando finalizó el muestreo. Se concluye que la inmunidad que induce la vacunación con la cepa Rev-1 conjuntival, independientemente del protocolo de vacunación empleado, es suficiente para prevenir la enfermedad por al menos cuatro años de haber iniciado el programa.

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR VACUNAS ATENUADAS E INACTIVADAS CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN BOVINOS

COMPARATIVE EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY ATTENUATED AND INACTIVATED VACCINES AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN CATTLE

Rial A.1*; Rivera-Patrón M.1*; Rossi A.1*; Maya L.2; Colina R.2; Machado M.3; Merchioratto I.4; Barrandeguy M.4; Menchaca A.4; Chabalgoity A.1

¹ Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

² Laboratorio de Virología Molecular, CENUR SALTO, UdelaR. Salto, Uruguay.

³ Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA Tacuarembó, Uruguay.

⁴ Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

^{1,2,3,4}: Instituciones participantes de consorcio para el desarrollo de una vacuna contra BVDV.

*las autoras contribuyeron de igual manera al trabajo.

jachabal@higiene.edu.uy

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) tiene alta prevalencia en Uruguay, pudiendo provocar desde infecciones subclínicas hasta cuadros graves de diarrea y aborto, siendo especialmente relevante en sistemas productivos intensivos. Aunque las vacunas vivas atenuadas han mostrado mejor eficacia, la normativa uruguaya solo permite utilizar vacunas inactivadas. En este contexto, se conformó un consorcio entre las instituciones participantes con el objetivo de investigar los mecanismos inmunológicos subyacentes de protección frente a BVDV para desarrollar vacunas más eficaces. Para ello, bovinos negativos para BVDV (n=3) recibieron una dosis de una vacuna comercial atenuada (Bovela, Boehringer Ingelheim), dos dosis de una vacuna comercial inactivada (Providean DVB_AT, Tecnovax Día 0 y 21), o PBS como control. Para comparar las respuestas inmunes humoral y celular se tomaron muestras de sangre los días 0, 7, 21, 28, 35, 49 y 63. La respuesta humoral se evaluó mediante ELISA indirecto,

evidenciando un aumento de niveles de anticuerpos anti-BVDV en animales vacunados a partir del día 21. Para evaluar la respuesta celular, se optimizaron ensayos para evaluar células productoras de IFN- γ e IL-17A mediante FluoroSpot, citometría de flujo y ELISA en sobrenadantes de cultivo. Se evaluó la estimulación con BVDV inactivado o infectivo, a diferentes concentraciones y tiempos, confirmando ausencia de toxicidad. Los resultados preliminares muestran que los vacunados con la vacuna viva atenuada presentaron una tendencia al aumento en la frecuencia de células productoras de IFN- γ e IL17A, detectadas mediante Fluorospot. Los datos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis y el post test de Dunn (no paramétrico). Aunque se optimizó la detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo frente a estímulos policlonales, esto no fue posible con antígenos de BVDV. Este trabajo constituye la optimización de las metodologías a utilizar en un ensayo de mayor escala, que iniciará a la brevedad

OTROS

ADAPTACIONES METABÓLICAS DEL ESTURIÓN RUSO FRENTE A LA INFECCIÓN BACTERIANA Y AL ESTRÉS TÉRMICO CRÓNICO

METABOLIC ADAPTATIONS OF RUSSIAN STURGEON TO BACTERIAL INFECTION AND CHRONIC THERMAL STRESS

Gómez, V¹; López-Radcenco, A¹; Aversa-Marnai, M^{2,3}; Costábile, A⁴; Quartiani, I⁵; Perretta, A⁵; Villarino, A⁴; Ferreira A.M^{2,3}; Silva-Álvarez, V^{2,3*}; Moyna, G^{1*}

¹ Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Udelar, Paysandú, Uruguay.

² Área Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³ Unidad de Inmunología, IQB, Facultad de Ciencias, Udelar, Montevideo, Uruguay.

⁴ Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Udelar, Montevideo, Uruguay.

⁵ Unidad de Acuicultura, Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo, Uruguay.

*mvsilva@fq.edu.uy; *gmoyna@fq.edu.uy

El aumento de la temperatura debido al calentamiento global representa un desafío para la acuicultura del esturión en países subtropicales como Uruguay. Durante el verano uruguayo, las altas temperaturas debilitan su sistema inmune, incrementando la mortalidad por infecciones. Nuestros estudios previos mediante secuenciación masiva de ARN en esturiones juveniles sometidos a estrés térmico crónico y/o infectados con la bacteria *Aeromonas hydrophila* mostraron que el calor alteró diversas funciones hepáticas. Particularmente, aumentó la expresión de genes vinculados a la respuesta al estrés, el plegamiento de proteínas y el metabolismo de lípidos y proteínas. El calor también afectó negativamente la respuesta antibacterial hepática. En el bazo, además de genes de respuesta al estrés, se indujeron genes vinculados a apoptosis y autofagia, una vía que permite reciclar componentes celulares. En este estudio ampliamos este análisis caracterizando los metabolitos séricos mediante resonancia magnética nuclear (¹H-RMN) en esturiones juveniles infectados con *A. hydrophila* y/o expuestos a estrés térmico crónico. El

análisis de componentes principales mostró diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$), mientras que el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales identificó que metabolitos asociados al metabolismo energético, como lactato, succinato y algunos aminoácidos, permiten discriminar esturiones infectados o con estrés térmico crónico de los controles ($p \leq 0.05$). Asimismo, estos metabolitos permiten discriminar esturiones expuestos paralelamente a ambos desafíos de aquellos infectados o sometidos a estrés térmico crónico por separado ($p \leq 0.05$). Resultados similares se observaron en esturiones juveniles cultivados en una granja acuícola en verano respecto al invierno. En conjunto, los resultados indican que la infección y el estrés térmico crónico inducen un metabolismo anaeróbico con acumulación de lactato y degradación de proteínas para sostener la demanda energética, en concordancia con la reprogramación metabólica observada en el hígado. Estos resultados aportan información sobre los mecanismos de respuesta a infecciones y estrés térmico crónico en el esturión ruso.

IMPACTO DE LOS FACTORES SOCIOECONÓMICOS DE LOS PEQUEÑOS PRODUCTORES EN SUS FINCAS

IMPACT OF SOCIOECONOMIC FACTORS OF SMALL-SCALE LIVESTOCK PRODUCERS ON THEIR HERDS

Tobón JC*; Luque PA.

Empresa Colombiana de Productos Veterinarios – VECOL S.A.; Bogotá – Colombia

*julio.tobon@vecol.com.co

El desarrollo de la ganadería en Colombia, en un entorno de violencia, con vías de difícil acceso para el ingreso de insumos y la comercialización de productos, junto a la poca inversión en diagnóstico, representa grandes desafíos para la sanidad animal. Este proyecto, en el marco de los PROYECTOS DE EXCELENCIA SANITARIA (PES), relacionó los factores socioeconómicos en 88 municipios del país, con el fin de identificar cómo afectan el estado sanitario de bovinos, ovinos y caprinos. Para ello, se tomaron muestras serológicas y se aplicaron encuestas en fincas a lo largo del territorio nacional. Los datos se enfocaron en la educación de los productores, la calidad del agua, las prácticas de manejo y su percepción sobre las enfermedades. Un hallazgo revelador fue el papel de la mujer: el 67% de las mujeres encuestadas realiza tareas de cuidado animal, lo que demuestra su rol crucial en la sanidad. El 80% de los productores tiene educación

básica, un factor que explica el desconocimiento de enfermedades no oficiales, un fenómeno común en Latinoamérica. La falta de acceso a agua potable (solo el 4,5 %) y el movimiento constante de animales entre fincas se identificaron como factores de riesgo clave. Más allá de la educación, el futuro de la sanidad animal en Colombia exige un cambio radical en la forma de abordar la ganadería. Este estudio demuestra que la sanidad y la rentabilidad están inseparablemente ligadas, y que no se pueden resolver los problemas de salud del ganado sin abordar las realidades socioeconómicas que las causan. La única vía para asegurar un futuro próspero y sostenible para la ganadería de pequeña escala es a través de un enfoque integral que priorice no solo la educación, sino también la inversión en infraestructura, el acceso a servicios básicos y la asistencia técnica de calidad.

INMUNOINTERVENCIÓN Y VACUNAS

DISEÑO DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA BASADA EN EPITOPOS B CONSERVADOS E INMUNOGÉNICOS DE DISTINTAS REGIONES DE MÉXICO, DE TEJIDOS DE INTESTINO, OVARIO Y GLÁNDULA SALIVAL DE *R. MICROPLUS*

DESIGN OF A CHIMERIC PROTEIN BASED ON CONSERVED AND IMMUNOGENIC B-CELL EPITOPES FROM DIFFERENT REGIONS OF MEXICO, DERIVED FROM INTESTINE, OVARY, AND SALIVARY GLAND TISSUES OF *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

*Morales-García JR^{1,2}, Pérez-Soria MME¹, Almazán-García C¹, Muñoz-Guzmán MA³, Hernández-Silva DJ¹, Castillo-Heredia L⁴, Mosqueda J¹.

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

² Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.

³ Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.

⁴ Laboratorio de Biogeografía e Integridad Biótica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

*jose.rodrigo.morales@uaq.mx

La garrapata (*Rhipicephalus microplus*) afecta de forma negativa la salud del ganado bovino. Para su control el uso de vacunas es una alternativa, actualmente es posible identificar péptidos conservados de diferentes antígenos de la garrapata, como el intestino, los ovarios y las glándulas salivales, y a partir de estos desarrollar una vacuna multiantigénica contra la garrapata. Diseñar una proteína quimérica *in silico* basada en epítomos B conservados e inmunogénicos de distintas regiones de México, de tejidos en intestino, ovario y glándula salival de *R. microplus*. Se seleccionaron y evaluaron péptidos de los diferentes antígenos de forma individual, inmunizando bovinos de la raza Holstein, con 100 µg de péptido, con un intervalo de 21 días aplicando de 4 a 5 inmunizaciones. Se obtuvieron los sueros de cada inmunización y se evaluaron mediante ELISA indirecta para determinar la generación de anticuerpos y mediante inmunohistoquímica comprobar que los anticuerpos detectan el antígeno blanco, posteriormente se hizo un constructo *in silico* con los péptidos seleccionados mediante herramientas bioinformáticas para poder

generar un gen que codifique a la proteína quimérica. Tres péptidos de Bm86 y Bm95 indujeron anticuerpos desde la segunda inmunización y presentaron inmunorreactividad en intestino. Dos péptidos de Serpina generaron anticuerpos con reactividad en ovario y glándula salival. Igualmente, dos péptidos de Vitelogenina y dos de Glutación S-transferasa mostraron respuesta humoral e inmunorreactividad positiva en tejido ovárico. La generación de anticuerpos fue estadísticamente significativa a partir de la segunda inmunización con respecto a los controles ($p=0.05$). A partir de estos péptidos inmunogénicos, se diseñó un constructo *in silico* empleando herramientas bioinformáticas de predicción de epítomos B (BCPred, BepiPred y ABCpred), y programas de modelado estructural como Chimera 1.19. Se logró obtener la secuencia y diseño *in silico* de un gen que codifica una proteína quimérica con base en epítomos B conservados, inmunogénicos y que identifican al antígeno en cepas de *R. microplus* de diferentes regiones de México.

DISEÑO Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE MULTI-ANTIGÉNICA Y MULTI-EPITÓPICA COMO CANDIDATO VACUNAL CONTRA LA BABESIOSIS BOVINA CAUSADA POR *BABESIA BOVIS*.

DESIGN AND EXPRESSION OF A MULTI-ANTIGENIC AND MULTI-EPITOPIC RECOMBINANT PROTEIN AS A VACCINE CANDIDATE AGAINST BOVINE BABESIOSIS CAUSED BY *BABESIA BOVIS*.

Cárdenas-Flores A^{*1,2}, Hernández-Silva DJ^{1,3}, Rodríguez-Torres A³, Tamayo-Sosa AR⁴, Ruiz-Manzano RA⁵, Hidalgo-Ruiz M⁶, Pérez-Almeida CQ^{1,7}, Mosqueda J^{*1,3}.

¹ Immunology and Vaccines Laboratory, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro.

² Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro.

³ Cuerpo Académico de Salud Animal y Microbiología Ambiental, Facultad de ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro.

⁴ Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, UABC. Mexicali, B.C.

⁵ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad de México.

⁶ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNACH, Tuxtla Gutiérrez, CHIS.

⁷ Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad de México

*joel.mosqueda@uaq.mx

La babesiosis bovina es la enfermedad del ganado transmitida por garrapatas más importante a nivel mundial, distribuida en zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde su vector, las garrapatas *Rhipicephalus*, son endémicas. La babesiosis causada por *Babesia bovis* es la que genera el cuadro clínico más grave. Aunque se han identificado diferentes proteínas involucradas en el establecimiento del patógeno tanto en el bovino como en la garrapata, al usarse individualmente como candidatos vacunales los resultados han sido poco satisfactorios. Por ello, una vacuna que combine diferentes antígenos del ciclo biológico del patógeno representa una alternativa prometedora. En este estudio, se diseñó in silico una proteína quimérica compuesta por 16 péptidos con epítomos B y T de 8 diferentes proteínas de *B. bovis*, cuya inmunogenicidad y efecto biológico de cada péptido fue evaluado previamente. A la versión del diseño quimérico se le predijo el peso molecular,

punto isoeléctrico, hidrofiliidad y estructura terciaria. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína quimérica y se envió a sintetizar en el plásmido de expresión pBAD/His-B para obtener proteína recombinante en un sistema bacteriano. La proteína purificada fue administrada vía subcutánea a bovinos en dosis de 50 y 100 µg/ml, formulada con Montanide ISA 201. Los anticuerpos generados fueron usados en microscopia confocal y Western Blot (WB). Como resultado se obtuvo una proteína de 415 aminoácidos, peso molecular de 49.7 kDa y punto isoeléctrico de 5.1. Los anticuerpos generados contra la proteína recombinante reconocen eritrocitos infectados con *B. bovis* mediante microscopia confocal y el suero de bovino infectado con *B. bovis* reconoce la proteína recombinante mediante WB. Esta proteína será utilizada en un desafío vacunal contra la babesiosis bovina causada por *B. bovis*. Financiado por: USDA, FOPER UAQ.

AUSENCIA DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS MATERNALES EN LA RESPUESTA INMUNE DE LECHONES JÓVENES VACUNADOS CON UNA BACTERINA DE *STREPTOCOCCUS SUI* SEROTIPO 2

LACK OF INTERFERENCE OF MATERNAL DERIVED ANTIBODIES ON THE IMMUNE RESPONSE OF YOUNG PIGLETS VACCINATED WITH A *STREPTOCOCCUS SUI* SEROTYPE 2 BACTERIN

Gottschalk M¹*, Cloutier L², Poulin M-C², Gaudreau A¹ and Segura M¹

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

² Centre de Développement du Porc du Québec, Québec, Canada.

*marcelo.gottschalk@umontreal.ca

Streptococcus suis is the most important bacterial pathogen affecting post-weaned piglets and is also a zoonotic agent. There are no commercial vaccines and the only alternative practitioners have is the use of autogenous vaccines (bacterins) based on the predominant strain(s) recovered in the affected farm. Depending on the farm, sows or young piglets are vaccinated; in the latter case, it is a common practice to vaccinate them at 1 and 3 weeks of age (WOA) to protect them during the nursery period (from 4 to 10 WOA). Although a potential interference with maternal derived antibodies (MDA) has been suggested, it has not been proven yet. The objectives of the present study were: a) to compare the immune response of piglets vaccinated at 1 and 3 WOA (in the presence of high MDA levels) vs those vaccinated at 3 and 5 WOA

(lower DMA levels); b) to use a newly developed model of colostrum-deprived conventional piglets (CDCP) to evaluate the interference of MDA with a bacterin-based vaccination of piglets at 1 and 3 WOA. Results showed a clear antibody response in piglets vaccinated at 3 and 5 weeks of age. On the other hand, piglets vaccinated at 1 and 3 weeks of age induced a stabilization of the decay of MDA when compared to control animals. Indeed, the sum of MDA and active response had as a consequence that levels of antibodies in piglets at 7 and 9 weeks of age were not statistically different between the two groups of vaccinated piglets. In conclusion, it was demonstrated that the presence of MDA does not significantly interfere with the active production of antibodies in young piglets.

RECOMBINANT PEPTIDOGLYCAN-ASSOCIATED LIPOPROTEIN (RPAL) FORMULATED WITH CPG-ODN/CO-ASC16 INDUCES A SPECIFIC HUMORAL RESPONSE IN CHICKENS AND REPRESENTS A CANDIDATE FOR A VACCINE AGAINST INFECTIOUS CORYZA

Felici, ME^{1,2}, Castell, SD^{1,2}, Quiroga, R^{3,4}, Huberman, YD*⁵, Maletto, BA*^{1,2}

¹ Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Córdoba, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Córdoba, Argentina.

³ Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Teórica y Computacional, Córdoba, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC-CONICET), Córdoba, Argentina.

⁵ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Área de Investigación y Producción animal, Bacteriología, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Avibacterium paragallinarum causes infectious coryza in chickens, an acute upper respiratory disease with major economic impact on poultry production worldwide. Whole-cell inactivated bacterins are the only commercially available vaccine, but they provide incomplete protection, particularly against heterologous strains, underscoring the need for improved immunization strategies. As a first step toward developing a broadly protective subunit vaccine, we used reverse vaccinology to identify antigen candidates from both local and public *Av. paragallinarum* genomes. An *in silico* pipeline was designed to predict and rank proteins with favorable features for expression and immunogenicity. Among the top candidates, the peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) emerged as a promising target. For recombinant Pal (rPal) expression, the Pal gene was codon-optimized, synthesized, and cloned into a pET-24a(+) vector. The construct was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and rPal was purified by cobalt-based immobilized metal affinity chromatography, followed by size-exclusion chromatography and endotoxin removal. To assess immunogenicity, 60 birds were randomly assigned into 6 groups of 10 chickens each: control (unvaccinated); rPal

alone; rPal with CpG-ODN/Co-ASC16 (a nanoadjuvant previously developed by our group); CpG-ODN/Co-ASC16 alone; a commercial trivalent vaccine; or the commercial vaccine plus rPal/CpG-ODN/Co-ASC16. Chickens were immunized subcutaneously at 6 and 10 weeks of age. Sera were collected before the second dose and 28 days later; rPal-specific IgY levels were measured by a homemade indirect ELISA. Statistical analysis used the Wilcoxon test ($p < 0.05$). No antibodies were detected in chickens immunized with rPal or CpG-ODN/Co-ASC16 alone at either time point ($p > 0.05$ vs. control). After the first dose, rPal-specific antibodies were detected in groups receiving rPal/CpG-ODN/Co-ASC16, the commercial vaccine, or the combination of both ($p < 0.05$ vs. control). After the booster, specific IgY levels were maintained or increased in these groups. The second rPal/CpG-ODN/Co-ASC16 dose significantly enhanced the response, reaching levels comparable to the commercial vaccine. The combination showed no synergistic effect. No adverse effects were observed. These findings support rPal/CpG-ODN/Co-ASC16 as a promising subunit vaccine candidate against infectious coryza.

DESARROLLO DE UNA VACUNA DE ARN MENSAJERO FRENTE A LA LEISHMANIOSIS CANINA

DEVELOPMENT OF A MESSENGER RNA VACCINE AGAINST CANINE LEISHMANIOSIS

De Urbina-Fuentes L*, Hurtado-Morillas C, Fernández-Rodríguez P., Mas A., Martínez-Rodrigo A., Domínguez-Bernal G.

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

*laudeurb@ucm.es

La leishmaniosis canina (Lcan) es una zoonosis vectorial causada por el protozoo *Leishmania infantum*. Las vacunas comercializadas presentan un amplio margen de mejora en la prevención de signos clínicos y no evitan el establecimiento de la infección. En este contexto, las vacunas de ARN mensajero (mRNA) se presentan como una alternativa para el desarrollo de mejores estrategias de prevención. El péptido HisDTC ha demostrado un alto nivel de protección *in vivo* frente a la infección por *L. infantum*. El objetivo de este estudio ha sido diseñar una plataforma de mRNA que codifique los antígenos derivados de HisDTC y optimizar su encapsulación en un sistema de vehiculación: las nanopartículas lipídicas (LNP). Utilizando técnicas de biología molecular, se optimizó la secuencia HisDTC incluyendo el agonista del receptor TLR-4, creando la nueva quimera cLEH4-M. Posteriormente, se insertó la secuencia codificante cLEH4-M en un vector previamente construido (pBAD-GFP), intercambiándola por el gen eGFP. La

transcripción *in vitro* del mRNA se llevó a cabo utilizando los vectores linealizados y, mediante transfección en macrófagos DH82 y posterior análisis por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, se observó una elevada eficiencia de traducción de los diferentes mRNA sintetizados, con un nivel de expresión intracelular del 85%, lo que sugiere el potencial de esta tecnología para el desarrollo de una vacuna frente a la Lcan. Empleando técnicas microfluídicas, se encapsuló en LNPs el mRNA codificante de eGFP y de cLEH4-M previamente purificados, monitorizando dicha encapsulación mediante el estudio de su expresión intracelular. Además, se evaluó mediante citometría de flujo el posible efecto citotóxico de diferentes concentraciones de LNPs en células DH82. Los resultados mostraron una viabilidad celular superior al 93% en todas las condiciones y un nivel de expresión del mRNA encapsulado del 90%, convirtiendo a estas formulaciones en una estrategia prometedora para vehicular construcciones vacunales.

NANOVACUNAS EN VETERINARIA: SEGURIDAD E INMUNOGENICIDAD DE HISDTC FRENTE A LEISHMANIA INFANTUM EN UN ENSAYO CLÍNICO EN PERROS

VETERINARY NANOVACCINES: SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF HISDTC AGAINST LEISHMANIA INFANTUM IN A CLINICAL TRIAL IN DOGS

Hurtado-Morillas C*, De Urbina-Fuentes L, Fernández-Rodríguez P, Mas A, Domínguez-Bernal G, Martínez-Rodrigo A.

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

*clarahur@ucm.es

La leishmaniosis canina (CanL) es una enfermedad zoonótica de alta relevancia en salud pública y medicina veterinaria producida por el protozoo *Leishmania infantum*. Aunque existen vacunas comercializadas, su eficacia es limitada y no garantizan una protección frente a la infección, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias vacunales más eficaces y duraderas. En este estudio se llevó a cabo un ensayo clínico doble ciego en 40 perros para analizar la seguridad e inmunogenicidad de HisDTC, un candidato vacunal peptídico frente a *L. infantum*, encapsulado en nanopartículas de PLGA y en combinación con los ligandos de los receptores tipo Toll 2 y 3 como adyuvantes. Para ello se empleó un protocolo de inmunización con dos dosis administradas por vía subcutánea y extracciones periódicas de sangre a lo largo de un año. La seguridad de las formulaciones se estudió mediante el seguimiento clínico de los animales. La respuesta inmunitaria inducida se caracterizó mediante

citometría de flujo estudiando las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria y productores de IFN- γ . Además, se estudió la respuesta humoral, determinado el isotipo de los anticuerpos y, mediante ensayos de infección en macrófagos derivados de sangre periférica, se evaluó su capacidad para controlar la infección. Los resultados revelaron que la vacunación con HisDTC induce una respuesta inmunitaria específica y sostenida frente a *L. infantum*, caracterizada por un incremento significativo de la producción de IFN- γ , un perfil humoral orientado a la síntesis de IgG2a, y el desarrollo de una población de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ de memoria. Esta polarización de la respuesta inmunitaria conduce a una reducción en la infección de los macrófagos superior al 80 % solo en los perros vacunados. No se registraron eventos adversos relacionados con la vacunación. Así, HisDTC se presenta como un candidato vacunal inmunogénico y seguro frente a la CanL.

DISEÑO IN SILICO DE UNA VACUNA MULTIEPITÓPICA DE ARNm FRENTE A *EHRlichia CANIS* MEDIANTE HERRAMIENTAS DE INMUNOINFORMÁTICA

IN SILICO DESIGN OF AN INMUNOINFORMATICS BASED MULTIEPITOPE mRNA VACCINE AGAINST *EHRlichia CANIS*

Fernández-Rodríguez P*, Mas A, Villaescusa A, De Urbina-Fuentes L, Hurtado-Morillas C, Martínez-Rodrigo A, Sainz A, Domínguez-Bernal G

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

*pefern02@ucm.es

La ehrlichiosis monocítica canina (CME) es una enfermedad infecciosa de transmisión vectorial cuyo agente etiológico es *Ehrlichia canis*, una bacteria intracelular obligada que transmite principalmente la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Afecta a los cánidos en general, siendo el perro su hospedador natural, y constituye un problema relevante bajo el enfoque "One Health" debido a su carácter emergente, su potencial zoonótico y la distribución global del vector. Además, el control y la prevención de esta enfermedad suponen un gran desafío, en gran medida por la ausencia de vacunas comerciales eficaces. El presente estudio empleó herramientas de predicción inmunoinformática para el diseño *in silico* de una vacuna multiepitópica de ARNm. Para ello, se seleccionaron tres proteínas antigénicas previamente descritas (*GP19*, *P28Omp19* y *VirB2*), a partir de las cuales se predijeron epítomos, considerando su afinidad con alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo 1 (MHC I) y 2 (MHC II) y células B de perros y primates. De aquellos epítomos que

presentaron mayor afinidad, se estudió su inmunogenicidad y su capacidad para inducir la producción de citocinas favorables para desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz. Una vez seleccionados los epítomos, se integraron en la secuencia vacunal y se valoró su interacción con linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, así como con células B. La construcción vacunal resultante se estudió para determinar su capacidad inmunogénica, alergénica, su toxicidad y sus propiedades fisicoquímicas. Finalmente, empleando modelos de simulación bioinformática, se analizó la respuesta inmunitaria desencadenada en los hospedadores. Los resultados obtenidos resaltan el potencial de las herramientas bioinformáticas en el diseño de candidatos vacunales, permitiendo seleccionar aquellos para los que se predice una mayor capacidad para inducir una respuesta inmunitaria eficaz. Asimismo, el diseño *in silico* permite optimizar las fases iniciales del desarrollo de vacunas, facilitando la selección de candidatos con mayor probabilidad de éxito.

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y SEGURIDAD DE UNA VACUNA RECOMBINANTE MULTI-EPITÓPICA CONTRA LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DEL CONEJO TIPO 2 (RHDV2)

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF A MULTI-EPITOPE RECOMBINANT VACCINE AGAINST RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS TYPE 2 (RHDV2)

Mosqueda, J.^{1*}, Rocha-Solache, M.^{*1,2}, Nieves-Morán, S.H.^{1,2}, Hernández-Silva, D.J.¹, Pérez-De la Rosa, J.D.³, Gómez-Soto, J.G.², Zambrano-Estrada, X.⁴, Solís-Hernández, M.⁵, Velasco-Elizondo, M.A.¹,

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

²Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

³Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

⁴Laboratorio de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁵Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, CPA-SENASICA.

*joel.mosqueda@uaq.mx

La cunicultura es una actividad pecuaria crucial en México, amenazada gravemente por la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo tipo 2 (RHDV2), de alta letalidad. Dada la necesidad de una vacuna recombinante efectiva, este estudio evaluó la seguridad e inmunogenicidad de una nueva propuesta vacunal. Se desarrolló una proteína quimérica recombinante basada en epítomos B y T de la VP60, la principal proteína estructural del RHDV2. Esta fue expresada en un sistema bacteriano, purificada y su identidad antigénica se confirmó mediante Western Blot con sueros de conejos infectados. Para la evaluación, 24 conejos Nueva Zelanda se dividieron en cuatro grupos (n=6): un control (solo adyuvante) y tres grupos inmunizados con 20, 40 o 60 µg de la proteína emulsionada con adyuvante comercial. El esquema consistió en dos dosis subcutáneas (días 0 y 21). La seguridad se monitoreó mediante observación clínica, temperatura rectal e histopatología. La inmunogenicidad se cuantificó mediante ELISA indirecto

para anticuerpos específicos en los días 0, 10, 21 y 31, analizándose los datos con ANOVA en GraphPad Prism®. Los resultados demostraron un perfil de seguridad aceptable. No se observaron alteraciones sistémicas graves. Las lesiones histopatológicas se limitaron al sitio de inoculación (dermatitis necrótica y paniculitis), efectos atribuibles principalmente al adyuvante. En cuanto a la inmunogenicidad, los grupos de 40 y 60 µg mostraron una producción de anticuerpos significativamente mayor ($p<0.05$) tras la segunda dosis (día 31). La dosis de 60 µg indujo la respuesta humoral más robusta, detectable desde el día 21. En conclusión, la vacuna recombinante demostró ser segura y capaz de generar una respuesta inmune humoral significativa en conejos, particularmente con las dosis de 40 y 60 µg. Estos hallazgos justifican la realización de estudios de desafío controlado para confirmar su eficacia protectora contra el RHDV2. Proyecto financiado por FOPER, y por FONFIVE-UAQ 2024.

PROTEÍNA DE FUSIÓN RECOMBINANTE PARA LA INMUNIZACIÓN ACTIVA CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO Y LA SUSTANCIA P PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR INFLAMATORIO CRÓNICO EN PERROS

RECOMBINANT NON-NATIVE FUSION PROTEIN FOR ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST NERVE GROWTH FACTOR AND SUBSTANCE P TO TREAT CHRONIC INFLAMMATORY PAIN IN DOGS

Costa, M^{1*}; Varela, V¹; Maciel, C¹; Gutiérrez, E²; Elgue, M²; Carrasco, S²; Barrera, E³; Crosignani, N²; Suárez, G²; Barbeito, L¹; Trias, E¹.

¹ Xeptiva Therapeutics, Montevideo, Uruguay.

² Unidad de Farmacología, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

³ Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Mendoza, Argentina.

The interplay between Nerve Growth Factor (NGF) and Substance P (SP) plays a critical role in driving neurogenic inflammation and chronic pain associated with osteoarthritis (OA). Current therapeutic strategies for canine OA, including anti-NGF monoclonal antibodies, are costly and offer limited long-term effectiveness. To address this gap, we developed a recombinant non-native fusion immunogen (rNGFSP) designed to induce the simultaneous production of antibodies targeting endogenous NGF and SP upon vaccination. This study aimed to evaluate the immunogenicity of rNGFSP in healthy dogs. This study was conducted on thirty healthy dogs of various breeds and both sexes, divided into five groups based on antigen doses (7-70 µg) and adjuvant concentrations (Montadine Gel 01, 0.5%–1%). The groups included: Control (excipient only), 7 µg/1%, 35 µg/1%, 70 µg/0.5%, and 70 µg/1%. Four subcutaneous doses were administered biweekly, and blood samples were collected on days 0, 14, 28, 42, and 56 post-vaccination.

Indirect ELISAs were performed to detect IgG levels and avidity to rNGFSP antigen, NGF, and SP. To assess the neutralizing capacity of these antibodies, competitive ELISAs using NGF-TrkA and mast cell degranulation assays with SP were conducted. The rNGFSP vaccine elicited a dose-dependent IgG response, with antibody levels increasing after the first booster, and achieving 100% seroconversion at the highest doses. In groups receiving 70 µg of antigen, IgG avidity exceeded 65% by day 56 post-vaccination. The vaccine successfully induced IgGs that cross-reacted with mature NGF and native SP, with avidity index exceeded 55% for both antigens. Functionally, these antibodies neutralize the interaction between NGF and TrkA and inhibit SP-induced mast cell degranulation. Together, these findings demonstrate that immunization with 70 µg of rNGFSP generates a strong humoral response against NGF and SP, with good avidity indices and neutralizing capacity, highlighting the therapeutic potential for canine OA.

LIPOSOMAS CATIÓNICOS SUPLEMENTADOS CON ADN PLASMÍDICO COMO INMUNOESTIMULANTE BOVINO

CATIONIC LIPOSOMES SUPPLEMENTED WITH PLASMID DNA AS BOVINE IMMUNOSTIMULANT

Camussone C^{1,2*}; Suarez Archilla G¹; Cicotello J^{1,2}; Aliprandi D¹; Molineri A¹; Peña A¹; Tello F. ¹; Miotti C¹; Werner B²; Astesana D¹; Zbrun MV¹; Signorini M¹; Diez C²; Garcia MI²; Veaute C².

¹ Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina. Ruta 34, Km 227, Rafaela (2300), Santa Fe, Argentina.

² Laboratorio de Inmunología Experimental, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, S3000ZAA, Santa Fe, Argentina.

*camussone.cecilia@inta.gob.ar

Las infecciones en ganado bovino generan importantes pérdidas económicas y el uso creciente de antimicrobianos ha provocado resistencias que constituyen un problema de salud pública. Las estrategias de inmunoestimulación representan una alternativa preventiva prometedora, especialmente aquellas basadas en moléculas definidas y vehículos que mejoren su efectividad. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar una formulación inmunoestimulante basada en liposomas catiónicos suplementados con ADN plasmídico comercial como prueba de concepto para prevención de infecciones en ganado bovino. Se prepararon liposomas catiónicos (dipalmitoilfosfatidilcolina:colesterol:estearilamina) por inyección etanólica y se evaluó su capacidad de encapsular ADN plasmídico (pVAX.1) en dos formulaciones: F1: liposomas + pVAX.1 20 µg/ml; F2: liposomas + pVAX.1 150 µg/ml. Posteriormente, estas formulaciones se administraron a 2 grupos de vaquillonas Holstein (n=3), las cuales recibieron una única dosis de 2 ml de cada formulación, por vía subcutánea. Un tercer grupo actuó

como control sin tratamiento. Se evaluaron parámetros hematológicos y clínicos, y producción de citoquinas en células estimuladas *in vitro*. Los liposomas encapsularon eficientemente el ADN en ambas formulaciones, manteniéndose estables por al menos 24 horas. La F2 indujo un aumento significativo del recuento leucocitario y de neutrófilos al día 7 post-inoculación ($p < 0,05$), y mayor producción de IFN γ ($p=0,05$) e IL1 β ($p=0,25$) en células estimuladas *in vitro*, a las 24 hs post-inoculación. Basándose en estos resultados, se seleccionó a F2 para un segundo ensayo (2 grupos; n=7): Grupo 1: liposomas + pVAX.1 150 µg/ml; Grupo 2: control sin tratamiento. En el grupo tratado se confirmó una tendencia hacia una mayor producción de IFN γ en células estimuladas *in vitro*, a las 24 hs post-inoculación ($p=0,06$), y un aumento del recuento de neutrófilos a las 48 hs post-inoculación ($p=0,005$). Esta prueba de concepto valida la estrategia y permite proyectar el desarrollo de plásmidos optimizados para su uso como inmunoestimulantes en ganado bovino.

RESPUESTA INMUNE EN INFECCIONES

1.- ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ BOVINOS DURANTE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA CRÓNICA NATURAL POR *S. AUREUS* EN LA INVOLUCIÓN ACTIVA.

STUDY OF THE FREQUENCY OF BOVINE T $\gamma\delta$ LYMPHOCYTES DURING NATURAL CHRONIC *S. AUREUS* INTRAMAMMARY INFECTION IN THE ACTIVE INVOLUTION PERIOD.

Battaglia IG^{1,2*}, Engler C¹, Miño P¹, Simonutti V¹, Silvestrini P¹, Dell Elce A¹, Stassi A^{1,2}; Dallard B^{1,2}, Baravalle C^{1,2}, Renna MS^{1,2}

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

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

*ileanabattaglia@gmail.com

Staphylococcus aureus es el patógeno mayor más frecuentemente aislado de mastitis bovina, causando infecciones intramamarias (IIM) crónicas difíciles de controlar. Debido a que el rol de los linfocitos T $\gamma\delta$ en las IIM por *S. aureus* permanece aún sin esclarecer, el objetivo de este estudio fue analizar la frecuencia y activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre y secreción en bovinos con IIM crónica natural durante la involución activa. Se utilizaron 11 vacas Holstein: 4 con cuartos no infectados y 7 con al menos un cuarto infectado. Se incluyeron cuartos mamarios libres de IIM (n=10) (controles) y cuartos con IIM crónica por *S. aureus* (n=12). Se recolectaron muestras de sangre y secreción a los días 0 (pre secado), 4, 7, 14 y 21 post secado (ps) a los fines de evaluar la frecuencia de los LT $\gamma\delta$ y su activación por citometría de flujo. En sangre, los porcentajes de LT $\gamma\delta$ se mantuvieron estables a lo largo

del tiempo (p=0,275). Sin embargo, el porcentaje de LT $\gamma\delta$ activados (CD44+ o CD62L+) fue mayor en animales infectados respecto a controles a los días 4, 7 y 14 ps (p<0,05). En secreción, se observó un aumento en los porcentajes de LT $\gamma\delta$ en cuartos infectados respecto de cuartos controles a los días 7 y 14 ps (p=0,033). Además, se observó un aumento en el porcentaje de LT $\gamma\delta$ CD44+ en cuartos infectados comparado con cuartos controles al día 4 y 14 ps (p<0,05) y un aumento en el porcentaje de LT $\gamma\delta$ CD62L+ en cuartos infectados respecto a cuartos controles al día 4 ps (p<0,05). Los resultados sugieren que la población innata de LT $\gamma\delta$ experimenta cambios durante la infección crónica por *S. aureus*, lo que indica su participación en la respuesta inmune del hospedador frente a la persistencia de la bacteria, en un intento de controlar el proceso infeccioso.

2.- LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE MACRÓFAGOS BOVINOS NO SE ASOCIA CON LA EDAD DEL GANADO

NITRIC OXIDE PRODUCTION AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BOVINE MACROPHAGES ARE NOT AGE-RELATED

Cortéz-Hernández O*, Jardón-Cano M, Juárez-Velázquez J, Gutiérrez-Pabello JA.

Laboratorio de Investigación en Brucelosis y Tuberculosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

*jagp@unam.mx

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se identificó una mayor respuesta pro-inflamatoria en granulomas de becerros infectados por *Mycobacterium bovis* y un menor control bacteriano. Estos resultados sugieren que la edad podría jugar un papel importante en la capacidad microbicida de los bovinos. El óxido nítrico (ON) es una molécula pro-inflamatoria con actividad antimicrobiana; sin embargo, se desconoce si la producción de ON y su actividad microbicida están asociadas a la edad del ganado. El objetivo de este trabajo fue determinar la producción de ON en macrófagos de bovinos de diferentes edades y su posible asociación con el control del crecimiento intracelular bacteriano. Se utilizó un grupo de 4 becerros menores a 5 meses y otro de 4 bovinos adultos, mayores a 5 años. Se determinó la producción de ON en sobrenadantes de cultivo de macrófagos estimulados con lipopolisacárido y se realizaron ensayos microbicidas utilizando *Salmonella typhimurium* como modelo de

infección, calculando la supervivencia intracelular y la fagocitosis. La concentración de ON fue en promedio de 19,95 μM (rango 19,93–21,48 μM) en becerros y de 15,98 μM (rango 11,01–18,64 μM) en adultos. El porcentaje promedio de supervivencia intracelular fue de 79,12% (rango 27,60–120,77%) en becerros y de 83,79% (rango 67,73–92,55%) en adultos. Las diferencias en la concentración de ON y el porcentaje de supervivencia intracelular entre grupos no fueron estadísticamente significativas. Los resultados muestran que, a pesar de que la concentración de ON tiende a ser mayor en becerros, esto no se relaciona con un mejor control de la infección y es muy heterogénea en el mismo grupo, algo que se ha reportado con anterioridad en ganado con tuberculosis. Nuestros resultados preliminares sugieren que la producción de ON y la capacidad antimicrobiana de macrófagos bovinos no se asocian con la edad del ganado.

3.- EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE CANDIDATOS VACUNALES CONTRA LA GARRAPATA BOVINA *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF VACCINE CANDIDATES AGAINST THE BOVINE TICK *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

Decia, L.^{*1}; Lasalvia, J.¹; Santana, N.¹; Navratil, A.¹; Correa, O.¹; Valledor, S.¹; Benavides, U.¹; Machado, M.²; Correa, A.²

¹ Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

² Instituto Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

*laura.decia@fvvet.edu.uy

En nuestro país, *Rhipicephalus microplus* y las enfermedades que transmite generan pérdidas anuales cercanas a 90 millones de dólares, principalmente por los costos de acaricidas y la mortalidad de los animales asociada a babesiosis y anaplasmosis. A ello se suman los perjuicios por residuos de acaricidas en la carne y sus derivados, con el consiguiente riesgo de restricciones en los mercados externos. El objetivo de este estudio fue determinar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones vacunales basadas en proteínas recombinantes de un antígeno intestinal de *R. microplus*. El estudio se realizó en el Campo Experimental N.º 1 de la Facultad de Veterinaria (Migues, Canelones) utilizando 45 terneros Hereford de 1,5 años, distribuidos en nueve grupos (n = 5) durante el año 2022. Las proteínas recombinantes fueron obtenidas por expresión en sistemas bacterianos, producidas y purificadas en la Unidad de Ingeniería de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Las formulaciones incluyeron variaciones

en el contenido proteico y se utilizó un adyuvante acuoso de uso común en el ámbito veterinario. Los animales recibieron tres dosis (días 0, 30 y 60). Se tomaron muestras de sangre individuales desde el día 0 y cada 30 días posteriores a la inmunización, hasta el día 180. La respuesta humoral específica fue evaluada mediante un ELISA indirecto con la placa sensibilizada con los antígenos inoculados. Los resultados demostraron que todas las formulaciones fueron inmunogénicas, mostrando un pico de anticuerpos a los 90 días de la primera inoculación. Una formulación presentó mayores niveles de anticuerpos IgG en comparación con el resto. En cuanto a seguridad, no se observaron efectos adversos en los sitios de inoculación, indicando que las vacunas fueron bien toleradas. La formulación que mostró mayores niveles de anticuerpos y, por ende, mayor inmunogenicidad, constituye un buen candidato para el desarrollo de una vacuna contra este parásito.

4.- EL EFECTO ANTIPARASITARIO DE LA AQUILUSCIDINA, CATELICIDINA DE *CROTALUS AQUILUS*, CONTRA *BABESIA BIGEMINA* ES MEDIADO POR LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

THE ANTIPARASITIC EFFECT OF AQUILUSCIDIN, A CATHELICIDIN FROM *CROTALUS AQUILUS*, AGAINST *BABESIA BIGEMINA* IS MEDIATED BY THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES.

Hernández-Arvizu, E.E.*¹, Rodríguez-Torres, A.², León Ávila, G.³, Vega y Murguía, C.², Rivas-Santiago, B. T.⁴, Mosqueda, J¹.

¹ Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, 76230 Querétaro, México.

² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, 76230 Querétaro, México.

³ Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala S/N, C.P. 11340, Casco de Santo Tomás, Ciudad de México, México.

⁴ Unidad de Investigación Médica Zacatecas-IMSS, Zacatecas, 98053 Zacatecas, México.

*esau.hernandez@uaq.mx

La babesiosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por *Babesia* spp., parásitos intraeritrocíticos que infectan a diversas especies animales. Actualmente, se ha incrementado el interés en la investigación y desarrollo de nuevos compuestos antibabesia, para lo cual se considera relevante la dilucidación de su mecanismo de acción. Las cateelicidinas, una familia de péptidos de defensa del hospedante, son moléculas de la respuesta inmune innata con efectos inmunomoduladores y actividad antimicrobiana directa. Previamente, estos componentes han demostrado ser efectivos contra protozoos intracelulares al alterar sus estructuras e inducir la muerte celular. La Aquiluscidina, cateelicidina identificada en la víbora de cascabel oscura de Querétaro (*Crotalus aquilus*), anteriormente evidenció actividad inhibitoria *in vitro* contra tres especies de *Babesia* que afectan al ganado bovino (*B. bigemina*, *B. bovis* y *B. ovata*). No obstante, el mecanismo de

acción no ha sido determinado. El objetivo del presente trabajo fue identificar el mecanismo antiparasitario de la Aquiluscidina contra *B. bigemina*. Eritrocitos parasitados fueron cultivados *in vitro* con 20 μ M (durante 4 h), y 14.48 y 20.70 μ M (por 24 h) de Aquiluscidina. Se evaluó la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) utilizando microscopía de fluorescencia. Se utilizaron agua y peróxido de Hidrógeno como controles negativo y positivo, respectivamente. El tratamiento con el péptido produjo un incremento en la generación de ROS en comparación con el control negativo ($p < 0.0001$), detectable a ambos tiempos de evaluación. En conclusión, el efecto antimicrobiano *in vitro* contra, *B. bigemina*, presentado por la Aquiluscidina implica un estrés oxidativo derivado de la sobreproducción de ROS, apreciable a las 4 y 24 h posteriores a la exposición al péptido, lo que contribuiría a la subsecuente muerte celular del parásito.

5.- DISTRIBUCIÓN DE GRANULOMAS EN BOVINOS JÓVENES Y ADULTOS INFECTADOS NATURALMENTE POR *Mycobacterium bovis*

GRANULOMA DISTRIBUTION IN *Mycobacterium bovis* NATURALLY INFECTED CALVES AND ADULTS

Isais-López J¹, Baay-Guzmán G², Bedolla-Alva MA³, Carrisoza-Urbina J³, Flores-Villalva S⁴, Huerta-Yepez S², Juárez-Ramírez M³, Gutiérrez-Pabello JA^{1*}

¹ Laboratorio de Investigación en Tuberculosis Bovina, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

² Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Ciudad de México, México.

³ Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

⁴ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Ciudad de México, México.

*jagp@unam.mx

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa de importancia económica y para la salud pública, ocasionada por *Mycobacterium bovis*. La lesión característica es el granuloma tuberculoide, compuesto principalmente por macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas y linfocitos T, B y γδ. Dependiendo del grado de infección, puede estar rodeado por una cápsula de tejido conectivo y contener áreas centrales de necrosis y mineralización. Nuestro equipo de trabajo ha descrito diferencias en la formación del granuloma de bovinos menores de 5 meses y mayores a 1 año, por lo que el objetivo del trabajo es analizar la distribución de los estadios de granulomas en bovinos jóvenes y adultos. Realizamos un muestreo por oportunidad de linfonodos mediastínicos de animales muertos por causas ajenas a tuberculosis. Las muestras se procesaron para análisis histopatológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen para identificar bacilos alcohol-ácido resistentes. Realizamos la caracterización molecular de las muestras mediante

PCR para la identificación de mpb70-M22, RD4 y RD9, confirmando la presencia de material genético de *Mycobacterium bovis* en los tejidos granulomatosos. Las laminillas con tejidos positivos fueron digitalizadas usando el equipo Aperio Scanscope, con lo cual se realizó el delimitaje y conteo de los granulomas en diferente estadio, utilizando el software QuPath. Cuantificamos 462 granulomas, correspondientes a 16 animales (8 becerros y 8 adultos), los cuales fueron clasificados acorde a características previamente reportadas. De los 462 granulomas, 319 (69 %) correspondieron a los becerros y 143 (31 %) a los adultos. En ambos grupos el estadio I de los granulomas fue el más frecuentemente encontrado 276/462 (59 %), teniendo una distribución de 61 % en becerros y 55 % en adultos. Nuestros resultados sugieren que los becerros muestran mayor permisividad a la diseminación de *Mycobacterium bovis* en los tejidos induciendo un mayor número de lesiones.

6.- EVOLUCIÓN DE LA SEVERIDAD INFLAMATORIA Y POBLACIÓN CELULAR DE LINFOCITOS B EN GINGIVOESTOMATITIS CRÓNICA FELINA POST-EXODONCIA

EVOLUTION OF INFLAMMATORY SEVERITY AND CELLULAR POPULATION OF LYMPHOCYTES B IN FELINE CHRONIC GINGIVOSTOMATITIS AFTER EXODONTIC TREATMENT

Medina M^{1*}, Algorta A^{1,2}, Varela B³, Tejera L⁴, Eguren J^{2,5}, Glausiuss MN², Turini G², Verdes JM³, Yaneselli K¹

¹ Unidad de Inmunología e Inmunoterapia, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

² Servicio de Odontoestomatología, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay.

³ Unidad de Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

⁴ Unidad de Imagenología, Análisis Clínicos y LEMA, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

⁵ Unidad de Cirugía y Anestesia de Pequeños Animales, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

*michaelamedinag@gmail.com

La gingivoestomatitis crónica felina (GECF) es una enfermedad inmunomediada, multifactorial y caracterizada por una severa inflamación localizada o difusa de la mucosa oral con la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario. Existe una evolución favorable al tratamiento quirúrgico con una reducción en la inflamación, pero existen pocos estudios que histopatológicamente cuantifiquen la severidad inflamatoria y población celular durante la evolución del post-tratamiento. El objetivo fue evaluar la evolución de la severidad inflamatoria y cuantificar la población celular con expresión del marcador CD20 pre y post-tratamiento quirúrgico de la GECF. Para ello, se seleccionaron 3 animales con GECF, a los cuales se les realizó exodoncia parcial. El seguimiento histológico se realizó mediante la toma de una biopsia de la mucosa oral caudal, los días 0 (exodoncia) y 30. La severidad de la inflamación se evaluó con tinción hematoxilina y eosina,

y para clasificar se utilizó un sistema de puntuación de la gravedad del cambio inflamatorio microscópico. Asimismo, se identificaron las poblaciones celulares mediante el marcaje por inmunohistoquímica con el marcador CD20 para linfocitos B. Se determinó el % del área de marcación mediante el software ImageJ para cuantificar la evolución. Como resultado se encontró que la exodoncia produjo una reducción de un punto de la severidad de la inflamación en 2/3 animales, mientras que uno mantuvo su puntuación. Además, se encontró un efecto beneficioso del tratamiento en todos los animales con reducción significativa del infiltrado de linfocitos B ($P=0,0289$). El porcentaje de área de marcación el día 0 fue $14,3 \pm 2,6 \%$ y al 30 fue de $9,6 \pm 3,8 \%$. En conclusión, vemos una mejoría en la mayoría de los gatos mediante la disminución de la puntuación inflamatoria y un menor infiltrado de linfocitos B post-tratamiento.

7.- EFECTO DE LA INFECCION INTRAMAMARIA CRÓNICA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SOBRE PARÁMETROS INMUNES SISTÉMICOS EN BOVINOS

EFFECT OF CHRONIC INTRAMAMMARY INFECTION BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ON SYSTEMIC IMMUNE PARAMETERS IN CATTLE

Miño PA^{*1}, Battaglia I^{1,2}, Cainelli S¹, Cola G¹, Molina M^{1,2}, Dallard B^{1,2}, Angeli E^{1,2}, Díaz PU^{1,2}, Ortega HH^{1,2}, Salvetti NS^{1,2}, Renna MS^{1,2}, Stassi AF^{1,2}.

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

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

*pilmaiquenm96@gmail.com

La mastitis bovina constituye una de las principales limitantes de la producción lechera, siendo *Staphylococcus aureus* el agente etiológico más frecuentemente aislado. Su presentación subclínica y crónica favorece la persistencia de la infección intramamaria (IIM). El objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones plasmáticas de interleuquinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e IL-1RA, así como el recuento de poblaciones inmunes sistémicas y células somáticas (RSC) en bovinos con IIM crónica por *S. aureus* (grupo infectado) y libres de IIM (grupo control). En el grupo infectado (n=8), se incluyeron animales con RCS > 250.000 cél/ml y con resultados bacteriológicos positivos para *S. aureus* en al menos 3 muestreos en la lactancia previa. En el grupo control (n=8), se incluyeron animales con RCS < 150.000 cél/ml y con bacteriología negativa. Se tomaron muestras de sangre entera y leche de todos los animales al día 48 posparto. Los datos se analizaron mediante una prueba t de Student. El RCS

fue significativamente mayor en el grupo infectado respecto al grupo control. La concentración de IL-1 β e IL-1RA fue mayor en el grupo infectado respecto al grupo control, mientras que la concentración de IL-6 fue menor en el grupo infectado respecto al grupo control. No se observaron diferencias en las concentraciones de IL-8 entre grupos. El recuento total de glóbulos blancos fue similar en ambos grupos. Sin embargo, el recuento relativo de granulocitos fue mayor en el grupo infectado, sin diferencias en el recuento absoluto. Por otro lado, el recuento absoluto y relativo de linfocitos fue menor en el grupo infectado respecto al grupo control, sin diferencias en los recuentos de monocitos. En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que la IIM crónica por *S. aureus* induce modificaciones en el perfil inmunológico que podrían estar relacionadas con la cronicidad del proceso infeccioso.

8.- NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO AGENTES INDUCTORES DE INMUNIDAD INNATA ENTRENADA EN BOVINOS

CHITOSAN NANOPARTICLES AS INDUCERS OF TRAINED INNATE IMMUNITY IN CATTLE

Monaco P^{1*}, Rodríguez Berdini L¹, Tiraboschi G¹, Bohl LP¹, Falcone RD², Porporatto C¹

¹ Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB, CONICET-UNVM), Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María.

² Instituto de Desarrollo Agroindustrial y de la Salud (IDAS, CONICET-UNRC), Universidad Nacional de Río Cuarto.

*pmonaco@unvm.edu.ar

La mastitis bovina es una enfermedad infecciosa de gran impacto productivo, económico y sanitario, responsable de importantes pérdidas por disminución de la producción y calidad de la leche, costos de tratamiento y descarte de animales. La creciente resistencia antimicrobiana y los mecanismos de evasión inmunológica de los patógenos dificultan su control, lo que ha impulsado la búsqueda de terapias complementarias. En este contexto, la inmunidad innata entrenada, capacidad de las células del sistema inmune de generar respuestas más eficientes tras una estimulación previa, se presenta como una estrategia innovadora para fortalecer las defensas del hospedador. Previamente se desarrollaron nanopartículas de quitosano (NPs-Q), un biopolímero con propiedades antimicrobianas e inmunoestimulantes, que mejora las limitaciones del polímero nativo. En este trabajo se evaluó su potencial para inducir entrenamiento inmune en células del sistema innato bovino y murino, empleando como segundo estímulo cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* V329 y *Escherichia coli* J5. La

respuesta funcional se analizó midiendo producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la sonda DCFH-DA y microscopía de fluorescencia, liberación de óxido nítrico (ON) con el reactivo de Griess en espectrofotometría, y expresión de citoquinas por RT-qPCR en células RAW 264.7 y BoMAC. Los resultados mostraron que las células pretratadas con NPs-Q incrementaron la producción de ROS frente a la infección bacteriana, indicando un efecto de entrenamiento inmune. Los ensayos de viabilidad celular (MTT) confirmaron que las NPs-Q no presentan citotoxicidad sobre BoMAC en las concentraciones evaluadas. Adicionalmente, se optimizó un protocolo de cultivo primario de macrófagos derivados de monocitos bovinos, obteniendo un enriquecimiento del 70% de células CD14+ según citometría de flujo, lo que aporta un modelo fisiológicamente más representativo. En conjunto, estos resultados sugieren que las NPs-Q pueden inducir inmunidad entrenada en bovinos y constituyen una alternativa prometedora para complementar las estrategias de prevención de mastitis.

9.- PREVIOUS EXPOSURE OF CATTLE TO ALPHAHERPESVIRUS TYPE 1 ALTERS THE INNATE IMMUNE RESPONSE PROFILE DURING CO-INFECTION BY *NEOSPORA CANINUM* AND BOAHV-1

LA EXPOSICIÓN PREVIA DEL GANADO AL ALFAHERPESVIRUS TIPO 1 ALTERA EL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DURANTE LA CO-INFECCIÓN POR *NEOSPORA CANINUM* Y BOAHV-1

Plá N.^{1,*}, Burucúa M. M.^{1,2}, Moore D. P.^{3,4}, Cheuquepán F. A.^{1,2}, Cobo E. R.⁵, Odeón A. C.⁴, Quintana S.^{6,7}, Marin M. S.^{1,2}

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina;

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina;

³ Unidad Integrada Balcarce (Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP/Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA), Balcarce, Buenos Aires, Argentina;

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP, Balcarce, Buenos Aires, Argentina;

⁵ Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada;

⁶ Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina;

⁷ Instituto de Biología Molecular Aplicada, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

*nataliapi996@gmail.com

Neospora caninum, an obligate intracellular protozoan, causes abortions in cattle. Bovine alphaherpesvirus type 1 (BoAHV-1), a major immunosuppressant, could promote bovine neosporosis. This study investigated the effect of prior exposure of cattle to BoAHV-1 on the expression of the TLR7 receptor, the cathelicidin BMAP28, and the cytokines TNF α and IFN γ , as well as their secretion, in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected with *N. caninum*. PBMCs were extracted and seeded (5×10^6 cells/well) from animals with or without prior natural exposure to BoAHV-1, and infected with the NC-1 strain of *N. caninum* (MOI: 0.2) and, one hour later, with the Cooper strain of BoAHV-1 (MOI: 0.1). At 24 hpi, cells were harvested for RT-qPCR gene expression analysis of TLR7, BMAP28, TNF α and IFN γ , and the supernatant was collected for cytokine secretion analysis by ELISA. The results show that, in naive animals, *N. caninum* induces BMAP28 expression (2,23-fold-change, $p < 0.05$), whereas co-infection reduces its expression (0,14-fold-change, $p < 0.05$) and enhances innate immunity

mechanisms, evidenced by a marked increase in TLR7 (7,89-fold-change, $p < 0.05$) and TNF α (5,02 fold-change, $p < 0.05$) gene expression, together with a slight, although not significant, increase in IFN γ translation, although without translation into cytokine secretion, suggesting early viral interference. In cattle previously exposed to BoAHV-1, *N. caninum* maintained the induction of BMAP28 (1,66 fold-change, $p < 0.05$) and increased the secretion of IFN γ , while co-infection maintained TLR7 induction (11,49-fold-change, $p < 0.05$), also increased the expression of BMAP28 and IFN γ (9,18 and 8,20-fold-change, respectively, $p < 0.05$) although it decreased the expression of TNF α (0,2-fold-change), compared to naive cattle. In conclusion, *N. caninum* alone induces effector mechanisms through BMAP28 in PBMCs, both in naive animals and in those previously exposed to BoAHV-1, and the prior exposure to BoAHV-1 alters the innate immune response via TLR7 induced by co-infection towards an immunomodulatory response with an increase in BMAP28.

10.- *NEOSPORA CANINUM* REGULATES ROS PRODUCTION IN A CRITICAL BALANCE DURING CO-INFECTION WITH BOAHV-1 IN NEURONAL CELLS

NEOSPORA CANINUM REGULA LA PRODUCCIÓN DE ROS EN UN EQUILIBRIO CRÍTICO DURANTE LA CO-INFECCIÓN CON BOAHV-1 EN CÉLULAS NEURONALES

Plá N.^{1*}, Rosales J. J.², Burucúa M. M.^{1,3}, Quintana S.^{4,5}, Pérez S.², Marin M. S.^{1,3}

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina;

² Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET-CIC-UNICEN);

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina;

⁴ Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina;

⁵ Instituto de Biología Molecular Aplicada, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

*nataliapi996@gmail.com

Neospora caninum, an obligate intracellular parasite that causes abortions in cattle, negatively modulates cellular production of reactive oxygen species (ROS), whereas bovine alphaherpesvirus type 1 (BoAHV-1), an immunosuppressive agent that may promote neosporosis, is a potent stimulator of ROS. Here, we evaluated ROS production and its relevance to *N. caninum* replication in co-infection with BoAHV-1. Human neuronal SH-SY5Y cells (2×10^4 cells/well) were cultured in 96-well plates and infected with *N. caninum* (strain NC-1, MOI 0.2) and/or BoAHV-1 (strain Cooper, MOI 0.1) with or without pretreatment with the ROS scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 h at 5 mM), H_2O_2 was included as a positive control. ROS production was measured using the CellRox probe and microplate reading. For *N. caninum* replication, SH-SY5Y cells were seeded in a 24-well plate (2×10^5 cells/well), and pretreated with NAC and infected with *N. caninum* or co-infected. All measurements were

performed at 1, 2, 3, 4, and 24 h post-initial infection with *N. caninum*. Infection with *N. caninum* and co-infection did not alter ROS production at the time points analyzed, maintaining ROS levels within the basal range, possibly as an immune evasion mechanism. Intracellular replication of *N. caninum* significantly decreased after NAC treatment at early times (1, 2, and 4 hpi), either in individual infections or co-infected cells suggesting that basal ROS favors replication of the parasite at the early steps of its cycle. However, at 24 hpi, NAC increased parasite replication, both in individual infections and co-infected cells, suggesting a restrictive role of ROS in parasite proliferation at advanced stages. In conclusion, *N. caninum* regulates ROS production in neuronal cells, independently of the presence of the virus, preventing its increase even in the presence of BoAHV-1. Understanding the role of ROS in these co-infections would be essential for a deeper knowledge on the parasite pathogenesis.

11.-DIFFERENTIAL PROTEIN EXPRESSION IN COLOSTRUM-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES FROM BOVINE LEUKEMIA VIRUS-INFECTED CATTLE ARE IMPLICATED IN IMMUNE REGULATION AND INFLAMMATION

PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DEL CALOSTRO DE BOVINOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ESTÁN IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y LA INFLAMACIÓN

Pérez CV^{*1}, Carignano HA¹, Marchetti YC¹, González DD², Mongini C¹

¹ Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas INTA-CONICET. Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

² Robert Koch Institut-13353, Berlin, Germany

*perez.cecilia@inta.gob.ar

Bovine leukemia virus (BLV) is an oncogenic retrovirus that naturally infects cattle. Once infected, the virus persists indefinitely throughout life at a transcriptionally silent stage. Soon after infection, humoral and cytotoxic activities efficiently abolish the viral replicative cycle, allowing only mitotic expansion of provirus-carrying cells. These anti-viral activities persist throughout the animal's life indicating that the immune system is permanently stimulated by BLV antigens. Although the production of viral proteins is abolished during the chronic stage, viral transcription is not completely shut down. Extracellular vesicles (EVs) are nano-sized lipid bilayer vesicles released from most cells and play multiple roles in cell-to-cell communication, including immune modulation, angiogenesis, and transformation of cells by transferring genetic material and functional proteins. Colostrum is rich in EVs carrying bioactive proteins and RNAs that reflect maternal physiology and immune status. In this study, we aimed to investigate BLV's impact on colostrum-EVs protein cargo. Colostrum EVs were isolated

using a protocol that combines acid pre-treatment with ultracentrifugation on sucrose gradients. Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis revealed a heterogeneous population of vesicles ranging from 40 to 120 nm in size, exhibiting the characteristic morphology of EVs. Flow cytometry analysis confirmed the presence of the EV markers CD9 and CD63. Quantitative proteomic analysis using a nanoLC/MS method revealed a total of 13 bovine proteins differentially expressed from a total of 1082 proteins identified (FDR < 0.05 and FC \geq |1.5|). Among them, 9 (69.2%) were underexpressed (e.g. ANXA1, CLU, DMBT1, LRRC32) and 4 (30.8%) were overexpressed (e.g. IDO1, MARCKS, LCP1) in the group of BLV-infected animals. These differentially expressed proteins are mainly involved in the regulation of immune responses and tumorigenesis. Overall, the results observed in colostrum derived EVs provide compelling evidence that BLV infection induced systemic molecular alterations that may modulate inflammation and the immune response.

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

12.- EVALUACIÓN DEL PERFIL LINFOCITARIO CIRCULANTE EN PACIENTES CON GINGIVO-ESTOMATITIS CRÓNICA FELINA

Algorta A^{1,2*}, Rial A³, Tejera L⁴, Medina M¹, Eguren J², Glausiuss MN², Turini G², Yaneselli K¹.

¹Unidad de Inmunología e Inmunoterapia, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

² Servicio de odontoestomatología, Unidad de Clínica y Cirugía de pequeños animales, Departamento de Clínicas y Hospital veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

³ Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR.

⁴ Unidad de Endocrinología y Metabolismo Animal (LEMA), Imagenología y Análisis Clínicos, Departamento de Clínicas y Hospital veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

*agustinaalgorta@gmail.com

La gingivoestomatitis crónica felina (GECF) se caracteriza por una severa inflamación oral de etiología incierta y multifactorial. A nivel sistémico se caracteriza por una reducción de la relación CD4/CD8. El tratamiento recomendado es la exodoncia con el fin de reducir el estímulo antigénico, el dolor y la inflamación. El objetivo de este estudio fue evaluar el perfil de linfocitos circulantes pre- y post- exodoncia en gatos enfermos. Para ello, se evaluó la evolución clínica de los felinos mediante una escala clínica específica (stomatitis disease activity index), comparando el día de la cirugía (Día 0) y 30 días post-cirugía (Día 30). Se evaluaron las poblaciones de linfocitos T y B circulantes, en muestras de sangre de 8 felinos (días 0 y 30), mediante citometría de flujo a través de la detección de los marcadores CD4, CD8 y CD21. Se analizaron los resultados mediante test t pareado. Se

observó una mejoría clínica en 5/8 gatos, evidenciándose una reducción significativa al día 30 ($p=0,03$). Además, se observó una reducción del porcentaje de células CD4+ al día 30 (Día 0=20,7±6,9 %, Día 30=16,9±6,1 %, $p=0,01$) y esta disminución se observó en 7/8 gatos. No se observaron diferencias significativas para los marcadores CD8 y CD21 ni en la relación CD4/CD8 siendo ésta de 1,2±0,6 al día 0 y de 1,3±0,7 al día 30. Se concluye, con los datos obtenidos hasta el momento, que los gatos tratados mediante exodoncia mostraron una mejoría clínica y una reducción de los linfocitos TCD4+ circulantes post-cirugía. La literatura de seguimiento de evolución del paciente tratado es escasa, constituyendo este estudio un aporte al entendimiento del perfil inmunológico del paciente tratado.

13.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE GALECTINA 13 EN LA PLACENTACIÓN TEMPRANA PORCINA. ESTUDIO PRELIMINAR

IMMUNOLOCATION OF GALECTIN 13 IN EARLY PORCINE PLACENTATION. A PRELIMINARY STUDY

Canovas M.L.¹; Rayer A.G.^{1*}; Etcheverry B.S.¹; Sanchez J.¹; Clauzure, M.^{1,2}; Williamson, D.M.¹; García, M.G.¹; Barbeito, C.G.^{2,3}; Velez, C.L.^{1,2}

¹ Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Calle 5 esq. 116. General Pico. La Pampa.

² CONICET.

³ Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. La Plata. Buenos Aires

*lorenacanvas92@gmail.com

Se ha demostrado que tanto la placenta materna como la fetal contribuyen a la expresión de las galectinas en mamíferos. Estas proteínas podrían ser claves en la regulación de sistema inmune materno, como así también en la apoptosis, la angiogénesis, la migración y la adhesión celular en la placenta. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de Gal-13 en la gestación temprana de las cerdas. Se utilizaron úteros de cerdas no gestantes y placentas de 17 y 30 días de gestación (dg). La expresión de Gal-13 se determinó por inmunoperoxidasa sobre cortes histológicos de útero no gestante (NG) y de placentas maternas y fetales porcinas. Los resultados se expresaron de un modo semicuantitativo siguiendo una determinada escala según la tonalidad de la inmunotinción: negativo (-), leve (+), moderado (++) y fuerte (+++). No se halló expresión de Gal-13 en útero NG en fase folicular. En cambio, en

útero NG en fase luteal se observó expresión intermedia en epitelio y alta en glándulas y vasos sanguíneos. A los 17dg, en placenta materna la inmunoeexpresión fue baja en epitelio, moderada en vasos sanguíneos y fuerte en glándulas. A los 17 dg, se expresó fuertemente en trofoblasto. A los 30dg, se observó en placenta materna expresión leve a intermedia en epitelio, intermedia en vasos sanguíneos y alta en glándulas. En placenta fetal, a los 30 dg, se halló inmunoeexpresión leve a intermedia en trofoblasto y leve en vasos sanguíneos. Según lo observado Gal-13 estaría presente en los primeros estadios de la gestación, regulando la vascularización y el microambiente inmune en la placentación temprana porcina. Se continuarán los estudios para establecer cual es el comportamiento espacio-temporal de la Gal-13 durante toda la gestación porcina.

14.- DESARROLLO DE UN ELISA IN HOUSE PARA EL DIAGNÓSTICO DE *NEOSPORA CANINUM*

Echeverría S.^{1*}, Ruppel F.¹, Hundewadt T.¹, Carrión, F.²; da Silva Silveira, C.³; Giannitti, F.³, Greif, G.¹, Cabrera A.^{1,4}, Robello C.^{1,5}

¹ Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patogeno, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Inmunovirología, UBP, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay

⁴ Unidad Académica de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay

⁵ Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay

*robello@pasteur.edu.uy

Neospora caninum es un parásito del filo *Apicomplexa*, causante de la neosporosis bovina, una de las principales causas de aborto en bovinos a nivel mundial. En Uruguay, se ha reportado una prevalencia aproximada del 22 % en ganado lechero y del 14 % en ganado de carne. A escala global, esta enfermedad provoca pérdidas económicas de millones de dólares; en Uruguay, un estudio estimó que, solo en el sector primario, las pérdidas alcanzan los 12 millones de dólares anuales. El diagnóstico de neosporosis se basa principalmente en métodos serológicos, dado que, en sistemas de producción extensivos, la recuperación de fetos para análisis es poco frecuente. En este contexto, nos propusimos desarrollar un kit ELISA empleando como antígenos dos proteínas de superficie, NcSAG1 y NcSRS2, producidas de forma recombinante en un sistema de expresión

eucariota. Para su validación, se analizaron sueros de bovinos abortados y de animales controles del sector lechero, previamente evaluados mediante cuatro kits comerciales y *Western blot*, con el fin de establecer el punto de corte del ensayo. Actualmente, estamos comparando el rendimiento de nuestro ELISA con un kit comercial en sueros de bovinos de carne (abortados y controles). Los resultados preliminares muestran que nuestro ELISA alcanza una sensibilidad y especificidad del 93 %, valores comparables a los obtenidos por kits comerciales. Esto indica que el desarrollo de este test de ELISA *in house* podría representar una alternativa viable y de menor costo para el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina en Uruguay, contribuyendo así a mejorar las estrategias de control y a reducir el impacto económico de la enfermedad.

15.- DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE MITOSIS EN MASTOCITOMAS CANINOS MEDIANTE PATOLOGÍA DIGITAL

AUTOMATED MITOSIS DETECTION IN CANINE MAST CELL TUMORS USING DIGITAL PATHOLOGY

Fuentes-Villegas A.D.¹, Orozco-Velázquez M. F.², Salas-Garrido G.², Carrisoza-Urbina J^{2*}, Baay-Guzmán G.³, Jimena Olveres¹, Escalante-Ramírez B.¹.

¹ Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

² Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

³ Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México.

*boris@cecav.unam.mx

Los tumores de mastocitos en perros son frecuentes y muestran comportamiento biológico maligno con diferentes grados de agresividad, lo que complica su clasificación y pronóstico. Evaluamos un sistema automatizado para detectar figuras mitóticas en WSI (whole slide image). teñidas con hematoxilina y eosina, como primer paso para localizar regiones de alta proliferación y avanzar hacia la caracterización del microambiente tumoral. Se estableció un flujo reproducible que incluye preprocesamiento de láminas mediante umbralización para excluir áreas sin tejido y generación de parches con solapamiento controlado; posteriormente, se entrenó una red de segmentación tipo U-Net para proponer candidatos a mitosis y una red neuronal convolucional (clasificador EfficientNet con ajuste fino) para confirmar dichas detecciones. El entrenamiento y la validación se realizaron con bases públicas curadas (por ejemplo, MIDOG y TUPAC), reservando otro conjunto (ICPR) para

evaluar la generalización entre dominios. A partir de las láminas de entrenamiento se obtuvieron 44 906 recortes anotados para segmentación; de las máscaras resultantes se extrajeron 30 235 recortes para clasificación (13 296 mitosis y 16 939 no mitosis). Al probar el sistema completo, la métrica F1 para detección de mitosis fue 0.55 en MIDOG y 0.52 en TUPAC (entrenado en MIDOG con ajuste fino en TUPAC), mientras que en ICPR, nunca visto durante el entrenamiento, fue 0.19. Estos resultados confirman desempeño adecuado en los dominios conocidos y revelan caída significativa ante cambio de dominio. Concluimos que la implementación clínica requiere estrategias explícitas para mejorar la robustez, tales como aumento de datos, normalización de tinciones y validaciones externas multicéntricas, además de su posterior evaluación en láminas propias de mastocitomas caninos con inmunohistoquímica complementaria con la finalidad de continuar mejorando el modelo propuesto.

16.- ENSAYO DE DOT-BLOT CON NS1 RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL: SU APLICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD EN ARGENTINA

DOT-BLOT ASSAY WITH RECOMBINANT NS1 OF THE BLUETONGUE VIRUS: ITS APPLICATION FOR THE DIAGNOSIS OF THE DISEASE IN ARGENTINA

Larsen, AE¹; Galarreta, S¹; Salina, MD ^{1,2}; Manfredi, MJ ¹, Sguazza, GH¹; Echeverria, MG^{1,2} y Mortola, EC*¹

¹ Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina;

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

*mortola@fcv.unlp.edu.ar

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral infecciosa de notificación obligatoria que afecta a rumiantes domésticos y silvestres. Está causada por el virus de la lengua azul (VLA), un Orbivirus de la familia *Reoviridae*. La enfermedad presenta una amplia distribución geográfica y en Argentina, ha sido documentada en el noreste del país. Si bien no hay brotes clínicos reportados actualmente, existe circulación viral. Esto resalta la importancia de fortalecer la vigilancia epidemiológica y de mantener actualizadas las medidas de prevención y control. En trabajos previos hemos reportado el empleo del Dot-Blot, utilizando antígeno viral nativo y pools de sueros, como un método tamiz, sencillo de realizar, sin necesidad de equipos costosos y atractivo para el diagnóstico. El objetivo del presente estudio fue emplear en la técnica de Dot-Blot la proteína no estructural 1 (NS1) del VLA producida en forma recombinante (rNS1) por nuestro equipo de trabajo en el sistema de baculovirus.

La NS1 es una proteína altamente conservada en los diferentes serotipos del virus, fácilmente purificable y muy estable. Se analizaron 20 sueros bovinos (10 control positivos y 10 control negativos). La técnica de Dot-Blot se realizó con los pasos habituales de la misma, empleando como antígeno 2 µl de rNS1 a una concentración de 300 µg/ml. Los resultados de este estudio arrojaron una concordancia total con los sueros del panel control. Ensayos adicionales con un mayor número de muestras son necesarios para el análisis estadístico correspondiente y la estandarización de la técnica para su uso en el diagnóstico serológico del VLA. La ventaja del uso de la rNS1, al ser una proteína no estructural del virus, radica en su potencial uso para diferenciar animales infectados de vacunados, cuando las medidas de control en Argentina recomienden el uso de una vacuna inactivada o vacunas a partículas virales sintéticas.

17.- BRIX BAJO LA LUPA: INEFICACIA EN LA EVALUACIÓN DE LA TRANSFERENCIA PASIVA DE INMUNIDAD EN POTRILLOS

BRIX UNDER THE SPOTLIGHT: INEFFECTIVENESS IN EVALUATING PASSIVE IMMUNITY TRANSFER IN FOALS

Manfredi, M^{*1,2}; Peñafiel, D¹; Salina, M^{1,2}; Barragán, JH³; Bonamy, M⁴; Larsen, A^{1,2} y Mortola, E^{1,2}

¹ Laboratorio de Inmunología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina

² CEMIBA (Centro de Microbiología Básica y Aplicada). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina

³ Cátedra Inmunología 2ª Parte. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina

⁴ Cátedra Producción Bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*mortola@fcv.unlp.edu.ar

En los potrillos neonatos, las inmunoglobulinas (Igs) del calostro se absorben en el intestino. Cuando ocurre una falla en la transferencia de inmunidad pasiva (FTPI), se compromete seriamente la vida del potrillo. La refractometría Brix (RB) es un método muy usado en los haras para estimar la concentración de Igs en el suero del neonato. La RB digital cuando se usa en líquidos que no contienen sacarosa, se aproxima a la cantidad de sólidos totales. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de RB para estimar una FTPI en neonatos y comparar el nivel de concordancia con una técnica "Gold Standard" de referencia como la electroforesis (EF). Sesenta muestras de suero neonatal se sometieron a la prueba de EF en acetato de celulosa y la concentración sérica de Igs totales fueron analizadas por densitometría con el programa CLIQS® (Core Laboratory Image Quantification Software). Estos resultados se compararon con la RB

evaluada a través del Refractómetro de Mano con ATC 28-62°Brix. Se estimó una correlación de Pearson entre los resultados de ambas pruebas de 0,5 ($p < 0,05$). El rendimiento y la concordancia se evaluaron utilizando las características de la prueba en umbrales óptimos y áreas bajo la curva ROC, y calculando el coeficiente kappa de Cohen, el cual resultó ser muy pobre ($k = 0,103$), de hecho, la probabilidad asociada a su valor no fue significativa. La sensibilidad y especificidad del RB en el punto de corte considerado como óptimo (9,25) fue 35 y 88%, respectivamente. Nuestros datos sugieren que, si bien el uso del RB podría ser de utilidad para evaluar la calidad del calostro, su aplicación como método diagnóstico para FTPI debe ser reconsiderado, y se recomienda continuar utilizando pruebas más precisas y validadas, como el inmunocrito, para garantizar un manejo adecuado del neonato.

18.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ANTAGONISTA DE PROGESTERONA, AGLEPRISTONE, EN TEJIDOS MAMARIOS CANINOS.

STUDY OF THE EFFECT OF THE PROGESTERONE ANTAGONIST, AGLEPRISTONE, IN CANINE MAMMARY TISSUES

Sanchez J.¹; Galeano M.F.²; Buey V.¹; García, M.G.¹; Lacolla, D.V.¹; Williamson, D.M.¹; Velez, C.L.^{1,3} y Vaquero P.^{1*}

¹ Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Calle 5 esq. 116. General Pico. La Pampa.

² Cátedra Patología general y anatomía patológica.

³ CONICET.

*pvaquero@vet.unlpam.edu.ar

La progesterona desempeña un rol clave en la regulación del ciclo estral y en la proliferación mamaria, lo que puede condicionar el desarrollo de procesos hiperplásicos y tumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del antagonista de progesterona, aglepristone (AGLE), sobre la expresión de receptores de progesterona (RP) y el marcador proliferativo Ki-67 en tejido mamario de perras clínicamente sanas. Se trabajó con 20 perras (1–6 años, 8–20 kg) en fase lútea, distribuidas aleatoriamente en dos grupos: tratado con AGLE (10 mg/kg, SC; n=10) y placebo (solución fisiológica; n=10). Se realizaron biopsias incisionales de glándula mamaria inguinal en día 0 y día 14. Se analizaron niveles séricos de progesterona mediante inmunoensayo, y las muestras de tejido fueron procesadas para estudio histológico e inmunohistoquímico de RP y Ki-67. Los datos se analizaron con pruebas estadísticas pareadas ($p < 0,05$). Los resultados mostraron que en el grupo AGLE

la progesterona sérica descendió significativamente ($26,58 \pm 10,74$ ng/ml en día 0 vs. $10,06 \pm 13,46$ ng/ml en día 14; $p=0,0098$), mientras que en el grupo placebo no hubo cambios significativos. La inmunexpresión de RP disminuyó significativamente en el grupo AGLE ($23,16 \pm 12,01$ % vs. $10,8 \pm 4,86$ %; $p=0,009$), mientras que en placebo no se observaron diferencias. En cuanto al marcador proliferativo, Ki-67 presentó una reducción marcada en AGLE ($23,74 \pm 8,3$ % a $7,45 \pm 3,43$ %; $p=0,0002$), con una disminución relativa del 64,15 %, frente a una reducción menor en placebo (16,19 %). Estos hallazgos evidencian que el aglepristone induce una inhibición significativa de la señalización progestacional y de la actividad proliferativa en tejido mamario normal de perras en fase lútea. Los resultados abren perspectivas sobre su potencial terapéutico en patologías mamarias dependientes de progesterona y refuerzan el valor del modelo canino en investigaciones comparativas.

19.- DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE GENERAR UNA RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS

DEVELOPMENT OF A PROTOCOL TO EVALUATE THE CAPACITY TO GENERATE AN IMMUNE RESPONSE IN CATTLE

Suárez Archilla G.*, Tello D'Elia F., Cicotello J., Peña A., Lobos G., Molineri A., Astesana D., Aliprandi D., Novoa B., Foster C., Welschen N., Signorini M., Zbrun M.V., Miotti C., Camussone C.

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina.

*suarezarchilla.g@inta.gob.ar

La detección de la respuesta inmune se utiliza para el diagnóstico indirecto de enfermedades transmisibles, como la detección de anticuerpos específicos para brucelosis y la intradermorreacción para tuberculosis. Distintos factores pueden afectar la capacidad para generar una respuesta inmune detectable. Nuestro objetivo fue diseñar un protocolo que permita identificar bovinos con menor capacidad de respuesta y los factores que pueden afectarla. Se conformaron tres grupos de terneros (n=4) inmunizados con 0,5mg/dosis de ovoalbúmina (OVA) y adyuvantes (liposomas catiónicos de desarrollo propio, $\text{Al}(\text{OH})_3$, o Montanide ISA206VG) y un cuarto grupo sin inmunizar. Se inmunizaron vía subcutánea los días 0, 44 y 161. La respuesta inmune humoral se evaluó mediante un ELISA *in house*, midiendo en sangre el nivel de IgG específica anti-OVA en 11 momentos, durante un periodo de 6 meses. La respuesta inmune celular se evaluó mediante una prueba de intradermorreacción cervical iniciada el día 166. Se

utilizaron cuatro puntos de inoculación, dos por lado del cuello. En cada lado, se inoculó intradérmicamente dos concentraciones diferentes de antígeno (1 mg/ml y 2 mg/ml), cada una por duplicado. Se midió el grosor del pliegue previo a la inoculación intradérmica y en 5 momentos posteriores, durante un periodo de 10 días. El grupo OVA+Liposomas produjo niveles detectables de IgG anti-OVA desde la primera inmunización, mientras que en los grupos OVA+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ y OVA+Montanide se detectaron IgG anti-OVA desde la segunda inmunización. En el grupo control no se detectaron IgG anti-OVA. El engrosamiento del pliegue en la prueba intradérmica no tuvo diferencias en las concentraciones utilizadas y sólo se diferenció ($p=0.037$) en el grupo OVA+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ a las 24hs post-inoculación. La inmunización con OVA+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ podría usarse para evaluar la capacidad de generar una respuesta inmune humoral y celular. Este protocolo nos permitirá avanzar en el estudio de fallas en el diagnóstico de enfermedades transmisibles.

20.- EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA-6 Y SU RECEPTOR DURANTE LA GESTACIÓN PORCINA

EXPRESSION OF IL-6 AND ITS RECEPTOR DURING PIG PREGNANCY

Williamson, D.M.¹; Giai, L.R.¹; Fuchs, K.¹; Rayer, A.G.^{1*}; Cánovas, M.L.¹; García, M.G.¹; Lacolla, D.V.¹; Vélez, C.L.^{1,2}; Clauzure, M.^{1,2}.

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, La Pampa, Argentina.

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

*mclauzure@vet.unlpam.edu.ar

La preñez en mamíferos requiere interacciones entre el embrión y el endometrio que implican la generación de una respuesta inmunitaria inflamatoria, la cual incluye numerosas citoquinas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de Interleuquina-6 (IL-6) y su receptor (IL-6R) durante la gestación porcina en homogenatos de placenta fetal (HoFP) y materna (HoMP). Como control, se utilizaron homogenatos de úteros no gestantes (NP). Se recolectaron placentas porcinas de 17, 30, 60, 70 y 114 días de gestación (dg) en mataderos de la zona. Utilizando un kit de ELISA específico de la especie, se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) de IL-6 a 30 ($132,3 \pm 5,17$ pg/ml), 60 ($152 \pm 5,15$ pg/ml) y 70 dg ($146,5 \pm 5,24$ pg/ml) en muestras de HoMP. En muestras de HoFP, la expresión de IL-6 mostró valores elevados a los 60 ($60,50 \pm 4,41$ pg/ml) y 70 dg ($56,25 \pm 5,54$ pg/ml). La determinación de la expresión de IL-6R se realizó

en estos períodos por tinción con inmunoperoxidasa. Los resultados se expresaron de modo cualitativo en función de la coloración detectada. A los 30 dg la expresión de IL-6R se encontró leve (+) en los epitelios que conforman la interfase placentaria y fuerte (+++) en vasos sanguíneos endometriales y linfocitos subepiteliales. A los 70 dg se encontró marca leve (+) tanto en los epitelios como en los vasos sanguíneos y linfocitos subepiteliales endometriales. Resultados preliminares de la expresión de IL-6 y IL-6R mediante PCR indicó también un aumento en estos períodos de gestación. A los 30 dg comienza la etapa de crecimiento exponencial de la placenta y a los 60-70 dg se produce el final del desarrollo placentario. La interacción IL-6/IL-6R podría indicar que IL-6 no solo participa en respuestas inflamatorias, sino también en remodelación de la arquitectura placentaria durante la gestación.

21.- USO DE PRUEBAS AUXILIARES PARA LA ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS EN RODEOS LECHEROS

USE OF ANCILLARY DIAGNOSTIC TECHNIQUES FOR THE ERADICATION OF TUBERCULOSIS IN DAIRY HERDS.

Zbrun MV^{1*}; Camussone C¹; Moyano RD²; Alonso MN^b; Cicotello J¹; Peña A¹; Molineri A¹; Miotti C¹; Astesana DM¹; Suárez Archilla G¹; Tello D'Elia F¹; Aliprandi D¹; Welschen NM¹; Signorini ML¹.

¹ Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Rafaela, Santa Fe, Argentina

² Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO, INTA-CONICET). Los Reseros y Nicolás Repetto, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

*zbrun.maria@inta.gob.ar

La tuberculosis bovina (bTB) es una enfermedad crónica de distribución mundial. El programa de erradicación de la bTB se basa, aunque no exclusivamente, en la aplicación del test de tuberculina en el pliegue anocaudal (CFT) y el sacrificio de todos los animales reaccionantes positivos. El programa de erradicación de bTB no ha mostrado los avances esperados, generando escepticismo entre los veterinarios y productores. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la prueba de ELISA en animales reactores negativos a la CFT como una estrategia complementaria en los programas de erradicación de la bTB. Se realizó un muestreo por conveniencia en rodeos lecheros de la Cuenca lechera central santafesina (Argentina), cuyos productores fueron contactados y aquellos que aceptaron participar fueron incluidos. Se realizaron dos estudios diferentes en ocho (Estudio 1) y seis (Estudio 2) rodeos lecheros. En cada estudio, las vacas presentes en cada establecimiento fueron testeadas

mediante CFT y aquellas negativas fueron reevaluadas empleando una prueba de ELISA. Este esquema se realizó en tres ciclos, uno por año durante tres años consecutivos (Estudio 1) o en tres ciclos consecutivos durante un año (Estudio 2). En el Estudio 1, la prevalencia de bTB al ELISA se redujo del 0,50 % al 0,02 % luego de tres años. En el Estudio 2, la prevalencia de bTB al ELISA se redujo del 2,29 % al 0,21 % al finalizar los tres ciclos consecutivos. Si bien la tendencia general fue hacia una reducción en la prevalencia, el comportamiento no fue homogéneo en todos los rodeos, evidenciando factores intrarodeo relevantes. La aplicación conjunta de CFT y ELISA (anual o cada 60-90 días) fue efectiva para reducir la prevalencia de bTB al ELISA. Los resultados sugieren el potencial de esta técnica como herramienta complementaria a las buenas prácticas de manejo en los rodeos para prevenir la entrada y difusión de la enfermedad.

INMUNOINTERVENCIÓN Y VACUNAS

22.- EFECTOS INMUNOMODULADORES DEL CANNABIDIOL: ATENUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA BOVINA

THE IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF CANNABIDIOL: ATTENUATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE IN BOVINE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Burucúa, M.M.^{1,2*}; Quintana, S.³; Plá, N.¹; Colman, S.¹; Marin, M.^{1,2}

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

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

³ Instituto de Investigaciones de Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), FCEyN, UNMDP-CONICET, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

*merburucua@gmail.com

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoides que presenta diversas funciones biológicas, entre las cuales destacan sus propiedades antiinflamatorias, asociadas a la capacidad para modular la producción de citoquinas proinflamatorias. Se ha demostrado que los cannabinoides ejercen su actividad inmunomoduladora a través de las vías de señalización mediadas por receptores tipo *toll* (TLRs) y NF- κ B, regulando genes de la respuesta inmune innata, entre ellos las catelicidinas. Sin embargo, los mecanismos específicos mediante los cuales el CBD regula la respuesta inmune innata en células inmunes bovinas permanecen indefinidos. En el presente estudio, se evaluó el efecto *ex vivo* de un extracto de *Cannabis sativa* rico en CBD en leucocitos de sangre periférica bovina mediante la exposición a distintas concentraciones del extracto (1, 2, 4 μ g/ml). A las 24 h post-tratamiento se analizó la expresión génica de los TLRs 4 y 7, la catelicidina bovina BMAP28, IFN β , IFN γ y TNF α mediante RT-qPCR. Por otro lado, los

niveles proteicos de TNF α e IFN γ fueron determinados por ELISA. Los resultados obtenidos evidencian un efecto predominantemente antiinflamatorio del extracto rico en CBD. Se observó una reducción significativa en la expresión de TLR4, TLR7 y TNF α , con inhibición máxima a 1 μ g/ml ($p < 0,05$; entre 0,2-0,3 veces), así como una disminución de BMAP28 e IFN β a todas las concentraciones evaluadas con respuesta máxima a 2 μ g/ml ($p < 0,05$; 0,38 y 0,05 veces, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con bajas concentraciones del extracto indujo un aumento significativo en la expresión génica y proteica de IFN γ . Estos hallazgos indican que el extracto rico en CBD ejercería una acción dual sobre el sistema inmune: reduce la expresión de genes de la respuesta innata, TLRs, BMAP28 y citoquinas proinflamatorias, mientras que potencia una respuesta celular, evidenciada por un incremento en la secreción de IFN γ , demostrando su potencial como compuesto bioactivo profiláctico/terapéutico en bovinos.

23.- DESARROLLO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE EXPERIMENTAL CONTRA *NEOSPORA CANINUM*: AVANCES PRECLÍNICOS EN MODELOS MURINOS

DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL RECOMBINANT VACCINE AGAINST *NEOSPORA CANINUM*: PRECLINICAL ADVANCES IN MURINE MODELS

Cabrera A.^{1,2*}, Echeverría S.¹, Ruppel F.¹, Carrión, F.³, Greif, G.¹, Robello C.^{1,4}

¹ Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

² Unidad Académica de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

³ Laboratorio de Inmunovirología, UBP, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

⁴ Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

*cabrera@pasteur.edu.uy

La neosporosis bovina, causada por *Neospora caninum*, es una de las principales causas de aborto en bovinos a nivel mundial. En Uruguay, constituye la primera causa de aborto en el sector lechero, con pérdidas anuales estimadas en 12 millones de dólares. Actualmente, no existe una vacuna ni tratamiento efectivos, lo que hace del diagnóstico y control de la enfermedad un desafío. Entonces, el desarrollo de una vacuna representa una necesidad urgente. El Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno ha avanzado en el diseño de una vacuna experimental basada en dos antígenos de superficie de *N. caninum*: NcSAG1 y NcSRS2. Estas proteínas fueron expresadas mediante el sistema de células S2 de *Drosophila* y posteriormente formuladas para ensayos de inmunización en modelos murinos. La combinación de estos antígenos fue evaluada tanto en un modelo de infección aguda como en un modelo de transmisión vertical. En el modelo de infección aguda, la vacuna mostró una acción eficaz, protegiendo a los ratones frente a un desafío con una dosis letal

de parásitos. Más importante aún, en el modelo de transmisión vertical, la vacunación no solo redujo significativamente la transmisión del parásito a la descendencia, sino que además previno el aborto en las hembras gestantes, abordando directamente la principal consecuencia patológica de la enfermedad. Para explorar los mecanismos asociados a esta protección, se realizó un análisis transcriptómico de placentas de ratonas vacunadas versus no vacunadas. Se identificó un conjunto de genes diferencialmente expresados, revelando distintas vías biológicas —incluyendo procesos metabólicos, replicativos y de respuesta inmunitaria— relacionadas con la infección y la interacción hospedero-patógeno durante la gestación. Estos resultados sugieren que la vacuna experimental basada en NcSAG1 y NcSRS2 es segura y muestra un perfil prometedor de eficacia, aportando evidencia que respalda su potencial en el desarrollo de una futura estrategia inmunoproláctica contra la neosporosis bovina.

24.- DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ESCALABLES Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNÓGENOS CONTRA EL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA UTILIZANDO CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA.

DEVELOPMENT OF SCALABLE STRATEGIES AND CHARACTERIZATION OF IMMUNOGENS AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS USING DROSOPHILA S2 CELLS.

Chá J^{1,2*}, Sagasti C¹, Salinas M¹, Arhancet^{1,2}, A. Demarco A^{1,3}, Rammauro F^{1,3}, Fló, M^{1,3}, Carrión F¹, Olivero-Deibe N¹.

¹ Laboratorio de Inmunovirología - Unidad de biofísica de proteínas "Prof. Dr. Otto Pritsch", Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

² Universidad ORT, Uruguay.

³ Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

*jcha@pasteur.edu.uy

El virus de la leucemia bovina (VLB) es un retrovirus oncogénico que causa leucosis bovina enzoótica (LBE), una enfermedad crónica que afecta mayoritariamente al ganado lechero, aunque se encuentra en aumento en bovinos de carne. La LBE genera pérdidas económicas relevantes en el sector, por su impacto en salud animal, productividad y comercio internacional. En Uruguay, la prevalencia en tambos supera el 80%, dificultando la aplicación de estrategias clásicas de control, por lo que el desarrollo de vacunas eficaces y seguras es crucial. En este contexto nuestro grupo ha generado y caracterizado inmunógenos recombinantes del VLB en células S2 de *Drosophila*: incluyendo la glicoproteína de envoltura (Env-Soluble) y partículas similares al virus (VLPs). Estos inmunógenos fueron caracterizados demostrando una conservación en sus características estructurales y funcionales necesarias para un adecuado

reconocimiento inmunológico lo que les confiere potencial para el desarrollo de vacunas. El objetivo actual es avanzar en la optimización de su producción y purificación, así como en su caracterización bioquímica y biofísica, y evaluar su inmunogenicidad en un modelo murino. En este marco, se produjeron lotes de la Env-Soluble con rendimientos de 10-14 mg/L, y se analizó el efecto de la remoción del tag de purificación sobre sus propiedades biofísicas y antigénicas. Se compararon parámetros de crecimiento y viabilidad de células S2 en condiciones estáticas y con agitación, determinándose que el cultivo estático resulta más apropiado para el mantenimiento prolongado. Asimismo, se están haciendo pruebas en un biorreactor para células eucariotas donde se evaluó la citotoxicidad de distintos antiespumantes, sin detectarse efectos adversos sobre la viabilidad en las concentraciones probadas.

25.- WHAT SERUM NEUTRALIZATION ASSAY REMINDS US ABOUT BOVINE ROTAVIRUS VACCINATION?

Durel L¹*, Harzer M²

¹ VIRBAC S.A., GM&MD, Carros (France)

² Universität Leipzig, Institute für Virologie (Germany)

*luc.durel@virbac.com

The group A Bovine Rotavirus (RVA) remains a significant pathogen of newborn calves. Several serotypes circulate in Europe, with a fluctuating distribution. All vaccines marketed in Europe are formulated with serotype G6P[1] (standard) or G6P[5] (rare). This study recalls the interest of serum neutralization tests in correctly assessing the effectiveness of vaccines against RVA. A population of heifers was screened for RVA antibodies (ELISA) and 48 were identified seronegative. Three months later, the selected animals were vaccinated with commercial vaccines (RC, n=11, strain G6P[5], or BS, n=11, G6P[1]), or left without vaccination (CTRL, n=10). Blood samples were taken on the day of vaccination (D0) to perform an ELISA test, and at D28 for a serum neutralization assay against RVA strains of serotype G5P[7] (porcine strain), G6P[1], G10P[11] and G6P[5]. Prior to the trial, the 48 animals constituted a cluster of weakly seropositive individuals (OD<25%). After 3 months (D0),

their serological status had changed, with most animals being seropositive (median OD>60). Twenty-eight days after vaccination, all animals were highly seropositive (OD>95%), including the CTRL group (OD>80%). SN assay revealed that all groups were weakly positive for G6P[5], with no significant difference between the vaccinated groups and the CTRL group. All groups were moderately positive against G5P[7]. All groups were positive against G10P[11]. All vaccinated groups were very positive against G6P[1], and differed significantly ($p<0.05$) from the CTRL group for this antigen. In this particular situation, animals suffered an unapparent infection likely caused by a RVA G6P[1], possibly G10P[11]. Vaccination against G6P[5] does not induce significant antibody production. Générique RVA vaccination first induces the production of antibodies against strains to which the animal has already been exposed.

26.- INTERFERENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS Y EXCRECIÓN EN LECHE DE LA VACUNA DELTA PGM

INTERFERENCE IN BRUCELLOSIS DIAGNOSIS AND SHEDDING IN MILK OF THE DELTA PGM VACCINE

Foster CN¹, Zbrun MV¹, Suarez Archilla G^{1*}, Lobos G¹, Gareis NC¹, Ugarte E¹, Novoa MB¹

¹ Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA - CONICET). Rafaela, Santa Fe, Argentina.

*suarezarchilla.g@inta.gob.ar

La brucelosis bovina es una enfermedad que afecta la producción pecuaria y la salud pública. En Argentina, se aprobó la vacunación de bovinos adultos con la vacuna deltaPGM basada en una cepa viva de *Brucella abortus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la vacunación de animales adultos interfiere con las pruebas para diagnóstico de brucelosis y si la cepa vacunal se excreta a través de la leche. Se utilizaron 20 vacas lecheras en producción de un rodeo libre de brucelosis. Diez se vacunaron con deltaPGM y 10 se inocularon con solución fisiológica. Se recolectaron muestras de suero y leche semanalmente para detección de anticuerpos, y muestras de leche para cultivo bacteriológico diariamente durante la primera semana y luego semanalmente durante 6 meses. Para detección de anticuerpos, las muestras de suero se analizaron por BPA, FPA, fijación del complemento (FC), ELISA de competición y ELISA indirecto (ELISAI) y las de leche por ELISAI. Para cultivo bacteriológico, se

sembraron 100 µl de leche de cada animal en agar sangre y se incubaron a 37°C con 10% de CO₂ durante 7 días. Las colonias compatibles fenotípicamente con *Brucella* se analizaron mediante PCR. Nueve vacas vacunadas resultaron positivas a la detección de anticuerpos en las distintas técnicas desde el día 7 y hasta 6 meses post vacunación (pv). En los cultivos se observaron colonias compatibles fenotípicamente con *Brucella* en la leche de seis vacas vacunadas. En el análisis de estas colonias por PCR se detectaron amplicones compatibles con *Brucella*. Para confirmar o descartar la excreción de *Brucella* deltaPGM en la leche de los animales vacunados se secuenciarán los amplicones obtenidos. Por lo tanto, se evidenció interferencia de la vacunación con las pruebas de diagnóstico de brucelosis y se confirmará o descartará la excreción de *Brucella* deltaPGM mediante secuenciación de las colonias aisladas.

27.- EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA INMUNOGENICIDAD DE CÁPSIDES VACÍAS RECOMBINANTES DE FMDV Y BACULOVIRUS PRODUCIDOS EN CRISÁLIDAS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS VETERINARIAS

IN VITRO EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF RECOMBINANT FMDV EMPTY CAPSIDS AND BACULOVIRUS PRODUCED IN PUPAE FOR THE DEVELOPMENT OF VETERINARY VACCINES

Lobo Gaitán, F. B.^{1*}; Tutti, S.⁴; Igarza, R. C.²; Miraglia, M. C.³; Filgueira, M.³; Arneodo Larochette, J. D.²; Taboga, O.¹; Molinari, M. P.^{1,4}

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Universidad Nacional de Moreno, Moreno, Buenos Aires, Argentina.

*lobogaitan.florencia@inta.gob.ar

Las vacunas basadas en partículas similares a virus (VLPs) han mostrado potencial para inducir inmunidad protectora frente al virus de la fiebre aftosa (FMDV). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la inmunización de ratones con VLPs confiere protección frente al desafío viral, resaltando su valor como candidatos vacunales. Sin embargo, aún es necesario optimizar su producción y caracterizar la contribución del baculovirus, presente en los productos intermedios del proceso de purificación de VLPs a partir de crisálidas, en la modulación de la respuesta inmune. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad inmunoestimuladora de los productos intermedios de crisálidas infectadas con el baculovirus recombinante AcP12A3Cfs, que expresa las proteínas estructurales de FMDV generando VLPs, sobre células dendríticas murinas, comparando diferentes protocolos de purificación. Se obtuvieron productos intermedios caracterizados por la masa antigénica de P12A3C y el total de baculovirus infectivo, los cuales fueron empleados para estimular células dendríticas derivadas

de médula ósea de ratón (BMDCs). La activación celular se evaluó mediante la expresión de marcadores de maduración por citometría de flujo y la producción de citoquinas por ELISA. Los resultados preliminares mostraron que los distintos protocolos de purificación generaron variaciones en la cantidad de baculovirus infectivo, lo que afectó la activación de CD40 y MHC II en BMDCs. Esto sugiere que protocolos menos estrictos permiten conservar baculovirus funcional, manteniendo la inmunogenicidad y reduciendo potencialmente los costos de producción. Además, la inclusión de baculovirus junto a VLPs puras potenció la activación de las células dendríticas, evidenciada por un aumento en los marcadores evaluados. En conclusión, los productos intermedios inducen la activación de células dendríticas *in vitro*, respaldando su potencial como vacunas de nueva generación contra FMDV. Estos hallazgos aportan información relevante sobre sus capacidades inmunitarias y contribuyen a optimizar formulaciones vacunales basadas en VLPs.

28.- VACUNA RECOMBINANTE DE DOSIS ÚNICA DIRECCIONADA A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO MURINAS MEDIANTE NANOANTICUERPOS

SINGLE-DOSE RECOMBINANT VACCINE TARGETING MOUSE ANTIGEN-PRESENTING CELLS WITH NANOBODIES

Padula-Roca, C^{*1}; Rossotti, M²; Lassabe, G¹; González-Sapienza, G.¹

¹ Área Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

² Human Health Therapeutics Research Centre, Life Sciences Division, National Research Council Canada, Ottawa, Canada.

*ggonzal@fq.edu.uy

El direccionamiento de antígenos hacia receptores de células presentadoras de antígeno (APCs) mediante anticuerpos es una estrategia prometedora para inducir respuestas de linfocitos T y B, con un precedente exitoso en la vacuna aprobada contra el virus de la diarrea viral bovina. En este trabajo desarrollamos una plataforma recombinante para expresar antígenos fusionados a anticuerpos monodominio de camélidos o nanoanticuerpos (*nanobodies* -Nbs-) dirigidos a receptores de APCs, y evaluamos su inmunogenicidad y eficacia en modelos murinos, considerando variables como la valencia, inclusión de fragmentos Fc y combinación con adyuvantes. Mediante la técnica de presentación en fagos, seleccionamos Nbs contra CD11c y CD40 murinos, expresados en células HEK293T como homodímeros de fusión a Fc y al antígeno modelo ovoalbúmina (Nb_{CD11c}-Fc-OVA; inmunógeno-direccionamiento), o como homodímeros con actividad agonista (Nb_{CD40}-Fc; adyuvante-activación). En 10 ratones C57BL/6, una dosis única de 5 µg de Nb_{CD11c}-Fc-OVA sin adyuvante indujo títulos de IgG anti-OVA

(cuantificados por ELISA) del orden de 10³ al día 7, mientras que una quimera no direccionada (Nb_{control}-Fc-OVA) no indujo títulos detectables a este tiempo. Los anticuerpos específicos persistieron por más de 100 días, y se incrementaron tras un refuerzo al día 78 en otro experimento. La coadministración de Nb_{CD40}-Fc potenció la respuesta humoral (título 10⁵) y promovió la activación de linfocitos T citotóxicos, efecto que no se reprodujo con otros adyuvantes pro-Th1 (CpG, nanopartículas ISCOM-MATRIX y Poli(I:C)). En un desafío con células de melanoma murino B16-OVA, 5/5 ratones que recibieron la vacuna direccionada y adyuvada fueron protegidos, en contraste con 3/5 que recibieron la vacuna no direccionada y adyuvada (estadísticamente no significativo) y 0/5 no vacunados (significativo). En conclusión, el direccionamiento de antígenos a CD11c y la activación de CD40 mediante Nbs constituye una plataforma vacunal robusta, potencialmente trasladable a otros animales y adaptable a múltiples antígenos.

29.- CO-LOCALIZACIÓN DEL ACMNPV CON TLR9 Y CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN DE GP64 EN EL CONTEXTO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

CO-LOCALIZATION OF ACMNPV WITH TLR9 AND CHARACTERIZATION OF GP64 GLYCOSYLATION IN THE INNATE IMMUNE RESPONSE

Tutti, S^{1*}, Lobo Gaitán, F. B.^{2*}, Vazquez, C. L.², Molinari, M. P.²

¹ Universidad Nacional de Moreno (UNM), Moreno, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO)- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

tutti.sofia@gmail.com; lobogaitan.florencia@inta.gob.ar

El *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) es un virus de insectos de la familia Baculovirus ampliamente utilizado como vector en terapias génicas y desarrollo de vacunas. Se ha reportado que receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como TLR9, participan en su detección reconociendo los motivos CpG de su ADN. El receptor de manosa (MR) dirige antígenos hacia compartimentos donde se encuentra TLR9, facilitando su activación. Este receptor posee ocho dominios CTLDs que reconocen residuos de manosa, fucosa y N-acetil-glucosamina. GP64, principal componente de la envoltura del AcMNPV, contiene cinco sitios de N-glicosilación, de los cuales cuatro son funcionales. En células de insecto, estas glicosilaciones producen estructuras de tipo paucimanosa, lo que convierte a GP64 en un posible ligando del MR. Esto sugiere que las modificaciones glicosiladas del virus podrían tener un rol relevante en su reconocimiento por parte del sistema inmune innato y en la activación de células dendríticas. El objetivo del trabajo fue estudiar

la co-localización del baculovirus con receptores de la respuesta inmune innata como TLR9 mediante microscopía confocal y caracterizar la glicosilación de GP64. Para ello, se infectaron células Sf9 con AcMNPV, se purificaron los viriones y se trataron con PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y nativas. Se realizó un Western blot para detectar cambios en el peso molecular de GP64. Además, se evaluó la co-localización del virus con TLR9 en diferentes tiempos post-infección. Se observó que el baculovirus glicosilado co-localiza con TLR9 en distintos tiempos post-infección. El tratamiento con PNGasa F evidenció una disminución en el peso molecular de GP64, indicando la remoción de N-glicanos. La co-localización observada con TLR9 indica que coinciden en un mismo compartimiento subcelular. La remoción enzimática de glicosilaciones mediante su tratamiento con PNGasa F surge como una herramienta para explorar su impacto en la maduración de células dendríticas.

ENSEÑANZA DE INMUNOLOGÍA VETERINARIA

30.- EFECTOS DE LA PANDEMIA Y REESTRUCTURACIÓN CURRICULAR DEL CURSO DE INMUNOLOGÍA EN LA FACULTAD DE VETERINARIA DE URUGUAY: UN ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PLAN 98 Y EL PLAN 21

EFFECTS OF THE COVID-19 PANDEMIC AND CURRICULAR RESTRUCTURING OF THE IMMUNOLOGY COURSE AT THE FACULTAD DE VETERINARIA, URUGUAY: A COMPARATIVE ANALYSIS OF PLAN 98 AND PLAN 21

Lasalvia J^{1*}, Borlido C², Rodriguez E², Algorta A¹, Benavides U¹, Yaneselli K¹

¹ Unidad de Inmunología e Inmunoterapia, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay.

² Departamento de Educación Veterinaria Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay.

*janainalasalvia96@gmail.com

La pandemia por COVID-19 generó un cambio sin precedentes en la educación universitaria, modificando tanto la modalidad de enseñanza como las condiciones de aprendizaje de los estudiantes, esto originó una transición rápida y forzada hacia los entornos virtuales e híbridos. En este contexto, la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Uruguay) atravesó además importantes transformaciones institucionales, entre ellas el pasaje del Plan 98 al Plan 21 y el traslado a la nueva sede. El análisis del curso de Inmunología (2012-2024) permite comparar dos etapas: pre-pandemia (2012-2019, Plan 98) y post-pandemia (2020-2024, con estudiantes bajo Plan 98 y Plan 21). Los indicadores evaluados incluyen los exonerados (estudiantes que no deben rendir examen de la materia); aprobados (estudiantes que deben rendir examen de la materia); no aprobados (estudiantes que no pueden rendir el examen) y no cursaron (estudiantes que abandonaron el curso). En el período pre-pandemia, los resultados expresados en las

actividades de evaluación evidenciaron un rendimiento favorable: aproximadamente un 14 % de estudiantes exonerados, 68 % aprobados, 8 % no aprobados y 7 % no cursaron. Post-pandemia, los resultados muestran dos realidades con diferencias entre planes. Bajo el Plan 98, las tasas de aprobación descendieron en comparación con la etapa previa y aumentaron los porcentajes de no aprobación y no cursaron. Por su parte, en el Plan 21, tuvo una adaptación significativa con aumento de los porcentajes de exoneración y aprobación y una disminución de los estudiantes que no aprobaron el curso y que no cursaron. Como conclusión podemos decir que el pasaje a la virtualidad e híbrido no afectó los resultados del curso de Inmunología. Sin embargo, la transición de planes mostró escenarios distintos: en el Plan 98 se observó un descenso en el rendimiento, mientras que en el Plan 21 se evidenció una mejora en los indicadores. Resulta necesario profundizar en los factores que explican estas diferencias.

OTROS

31.- EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA BOVINA ESTIMULADAS CON PROGESTERONA Y CO-CULTIVADAS CON MACRÓFAGOS BOVINOS

IN VITRO ASSESSMENT OF CYTOKINE SECRETION AND REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN BOVINE GRANULOSA CELLS STIMULATED WITH PROGESTERONE AND CO-CULTURED WITH BOVINE MACROPHAGES

Cainelli S¹, Miño PA¹, Renna MS^{1,2}, Simonetto C¹, Belotti EM^{1,2}, Baravalle ME^{1,3}, Storani G^{1,2}, Rey F^{1,2}, Ortega HH^{1,2}, Salvetti NS^{1,2}, Stassi AF^{*1,2}.

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

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

³ Centro Universitario Gálvez, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Gálvez, Santa Fe, Argentina.

*antonelastassi@gmail.com

En el ganado bovino, las concentraciones intermedias/subluteales de progesterona (P4) se han relacionado con la anovulación. Además, la infiltración de células inmunes, como los macrófagos, en los folículos preovulatorios es crucial para permitir la secreción de factores locales como proteasas y citoquinas responsables de la ovulación. Es por ello que nos propusimos evaluar los niveles de citoquinas relevantes y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en una línea de células de la granulosa bovina (BGC-1) luego de la estimulación con P4 y el co-cultivo con macrófagos bovinos durante 24h. Los tratamientos fueron: T1: basales, T2: 20 ng/mL de P4, T3: co-cultivadas con macrófagos bovinos, y T4: co-cultivadas con macrófagos y con 20 ng/mL de P4. Evaluamos las concentraciones de interleuquina (IL)-1 β , IL-1RA, IL-4, IL6 e IL-8 en sobrenadante de cultivo mediante ELISA y la producción de ROS en las BGC-

1 mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante modelo lineal generalizado. La concentración de IL-1 β fue similar en todos los tratamientos. La concentración de IL-1RA fue mayor en el T2 que en T1 y T3. La concentración de IL-4 fue menor en el T4 que en T1 y T2. La concentración de IL-6 fue menor en el T2 que en T1 y T3, siendo indetectable en el T4. La concentración de IL-8 fue mayor en el T4 que en el resto de los tratamientos. Finalmente, el porcentaje de células productoras de ROS fue mayor en el T2 que en el resto de los tratamientos, siendo además, mayor en el T4 que en el T1. Podemos concluir que la P4 tiene un efecto modulador de la secreción de citoquinas y producción de ROS sobre las células BGC-1 y que la interacción con los macrófagos colabora en dicha modulación, destacando el rol del sistema inmune en la reproducción bovina.

32.- BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE LA PROTEASA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA

SEARCHING FOR INHIBITORS OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS PROTEASE

Sagasti, C^{*1,2}; Olivero, N¹; Fló, M^{1,2}.

¹ Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

² Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

*csagasti@pasteur.edu.uy

El virus de la leucemia bovina (VLB), es un deltaretrovirus oncogénico que infecta linfocitos B del ganado. Causa la leucosis bovina enzoótica, una enfermedad que afecta principalmente al ganado lechero y provoca importantes pérdidas económicas. Hasta el momento no existen tratamientos ni vacunas aprobadas; por ello, el diagnóstico y la eliminación de animales infectados constituyen la única estrategia de control disponible, aunque resulta inviable en países con alta prevalencia (como Uruguay y Argentina). En este contexto, la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias de control adquiere una relevancia fundamental. Un potencial blanco farmacológico es la retropeptidasa viral (PR-VLB), que es esencial para su ciclo, ya que escinde la poliproteína Gag, dando lugar a la maduración y adquisición de capacidad infectiva de la partícula viral. En este proyecto, evaluamos la actividad inhibidora de dos familias de compuestos, carboranos y metalocarboranos, sobre la PR-VLB. Se cribaron más de 50 compuestos mediante ensayos de actividad enzimática en placas de 96 pocillos, utilizando PR-VLB

recombinante y sustratos fluorogénicos. Además, se realizaron estudios del impacto de la estabilidad térmica del complejo enzima-compuesto mediante análisis de estabilidad térmica de la proteasa en presencia de los compuestos, registrando la fluorescencia intrínseca de triptófanos/tirosinas en función de la temperatura. El ensayo de actividad enzimática en presencia de los compuestos mostró parámetros satisfactorios de señal-ruido, así como del factor estadístico Z'. Identificamos ocho inhibidores (IC_{50} 1–10 μ M) y, de forma interesante, seis compuestos que potenciaron la actividad enzimática. Observamos que la mayoría de los inhibidores desestabilizan a la PR-VLB, mientras que los potenciadores no afectan su estabilidad. Nuestros resultados amplían la lista de compuestos con actividad inhibidora sobre esta enzima (hasta ahora limitada a solo siete reportados) y aportan información valiosa para el desarrollo de nuevas moléculas con potencial actividad antiviral.

33.- FORTALECIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO VETERINARIO EN MÉXICO MEDIANTE EL DESARROLLO DE PRUEBAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HEMOPARÁSITOS BOVINOS

STRENGTHENING VETERINARY DIAGNOSTICS IN MEXICO THROUGH THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR TESTS FOR THE DETECTION OF BOVINE HEMOPARASITES

Vega-Rojas LJ^{*1,2}, Velázquez-Santizo SB³, Reyes-Silva RA³, Acuña Ontiveros KF⁴, Mosqueda J¹ and Hidalgo-Ruiz M^{1,4}

¹ Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Querétaro, México.

² Secretaría de Ciencias, Humanidades y Tecnologías (SECIHTI), Ciudad de México, México.

³ Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.

⁴ Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Campus II, Universidad Autónoma de Chiapas, México.

*lineth.vega@uaq.mx

Las enfermedades hemoparasitarias como la babesiosis (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*) y la anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) bovinas representan un desafío importante para la salud animal debido a su capacidad de alterar la respuesta inmunitaria. Estas infecciones inducen anemia hemolítica, inmunosupresión y una disminución en la respuesta frente a coinfecciones y vacunación, lo que repercute en la productividad pecuaria y en la eficacia de programas de control sanitario. El diagnóstico temprano y preciso es esencial, pero los métodos convencionales, como frotis sanguíneos, presentan limitaciones de sensibilidad, especialmente en infecciones crónicas o de baja parasitemia. En contraste, la PCR en tiempo real ofrece mayor precisión y reproducibilidad, por lo que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) recomienda impulsar laboratorios de referencia con técnicas validadas. En este contexto, el Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro y la Unidad de Diagnóstico Integral (UDI) de la Universidad Autónoma de Chiapas desarrollan un ensayo de PCR múltiple en

tiempo real para la detección simultánea de *B. bovis* y *B. bigemina*. El diseño del protocolo incluyó sondas e iniciadores específicos para los genes SBP4 y P58 (Primer3Plus, NCBI, IDT), permitiendo la identificación diferencial de ambas especies en una sola reacción. Esta estrategia optimiza el uso de muestras biológicas, reduce el tiempo de procesamiento y disminuye costos. La estandarización del protocolo individual permitió evaluar la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad del ensayo, con reacciones positivas específicas y ausencia de amplificación inespecífica; demostrando su potencial como herramienta diagnóstica confiable a través de una PCR multiplex en tiempo real. Estos resultados representan un avance en la consolidación de una red nacional de laboratorios de referencia en inmunodiagnóstico veterinario, que fortalecerá la vigilancia epidemiológica y contribuirá a mejorar la salud animal y la productividad pecuaria en México. Financiado por: Convocatoria de Ciencia de frontera 2025: Secretaría de Ciencias, Humanidades y Tecnologías (SECIHTI).