



Universidad de la República - CSIC

**Formulario de Informe final del Programa de Apoyo
a la Investigación Estudiantil
Edición 2014**



DATOS DEL PROYECTO	
<ul style="list-style-type: none">• Título del Proyecto: Interferencia de la Leucosis bovina enzoótica en la respuesta inmune de bovinos inmunizados contra Fiebre Aftosa a campo.	
<ul style="list-style-type: none">• Número ID del proyecto: 77	
<ul style="list-style-type: none">• Área de conocimiento: Inmunología	
<ul style="list-style-type: none">• Facultad o Servicio: Facultad de Veterinaria UdelaR	
<ul style="list-style-type: none">• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Agustina Algorta Turini, Nis Rossina Popovich Furtado	
<ul style="list-style-type: none">• Correo electrónico del/de la estudiante referente: alfi_agus@hotmail.com	
<ul style="list-style-type: none">• Nombre completo del/de la docente orientador-a: Rodrigo Puentes Palombo	
<ul style="list-style-type: none">• Correo electrónico del/de la docente orientador-a: rodrigopuentes2011@gmail.com	

INFORME FINAL

(desde ítem 1 a 7 la extensión máxima POR ÍTEM es de una carilla)

1) Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada

Objetivo general: Evaluación del efecto del virus de la Leucosis bovina enzoótica (BLV) en respuesta a la vacunación contra Fiebre aftosa.

Objetivos específicos:

1. Determinar el nivel de inmunoglobulinas producidas contra Fiebre aftosa en bovinos infectados con BLV y vacunados contra Fiebre Aftosa.

2. Evaluar la relación IgG1/IgG2a en bovinos infectados luego de la vacunación contra Fiebre Aftosa.

2) Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.

1) Obtención de muestras de sangre con y sin anticoagulante de bovinos Holando de aprox 8 meses 15 días previo a la vacunación (día 0) contra Fiebre aftosa y luego 15, 60, 165, 300 días post vacunación.

2) Centrifugado de sangre, extracción de suero y almacenamiento del mismo hasta procesamiento

3) Detección de anticuerpos anti Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) mediante ELISA comercial (IDEXX Europe, The Netherlands, ref P02110-10)

4) Realización de hemograma de las muestras de animales positivos a LBE de los muestreos 0, 15 y 60 para identificar animales con linfocitosis persistente, mediante analizador automático HumaCount - Human Diagnostics Worldwide y recuento diferencial mediante frotis y tinción con MayGrumuald-Giemsa.

5) Detección de anticuerpos vacunales anti Fiebre Aftosa (FMD) cepa A24/Cruzeiro realizada en INTA Castelar - Buenos Aires, en el marco de una pasantía de capacitación:

- Detección de anticuerpos totales anti FMD mediante Elisa de bloqueo en fase líquida (LPBELISA) (CEVAN-ICT Milstein (CONICET) lote 1487).

- Detección de isotipos IgG1 e IgG2 anti-FMD mediante ELISA.

- Detección de IgM anti-FMD mediante ELISA.

- Evaluación de avidéz de anticuerpos anti-FMD mediante ELISA.

Los ELISA utilizados fueron diseñados por INTA (Lavoria et al, 2012), a excepción del ELISA fase líquida para el que se utilizó un kit comercial.

9) Análisis de datos utilizando tablas de Excel, gráficas elaboradas en Graphpad.

3) Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.

Las etapas planteadas en el cronograma fueron cumplidas en su totalidad. Las modificaciones

realizadas fueron a nivel de metodología. Surgió la posibilidad de realizar la detección de anticuerpos anti-FMD cepa A24/Cruzeiro en INTA Castelar (laboratorio de referencia para Fiebre Aftosa), Buenos Aires ya que el laboratorio cuenta con mayor disponibilidad de pruebas serológicas. Por lo tanto pudimos realizar la detección de anticuerpos totales por una técnica mas específica y sensible que la planteada en el plan de trabajo original. Se realizó no solo la detección de los isotipos IgG1 e IgG2 como se planteó en el plan de trabajo, sino que también se pudo detectar IgM y evaluar avidéz de los anticuerpos mediante técnicas de ELISA diseñados por el laboratorio.

- 4) Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no - con los resultados esperados por parte del equipo.

Se muestrearon un total de 71 animales al día 0, 15, 60, 165, 300. Cincuenta y nueve de estos 71 animales pudieron ser seguidos en el tiempo. Estas muestras fueron analizadas por ELISA comercial para detectar presencia de anticuerpos anti BLV. Se obtuvieron 18 muestras negativas, 27 positivas a BLV y 14 animales seroconvirtieron durante ese período. Se realizaron hemogramas mensuales, durante 3 meses, a las muestras positivas a BLV para detectar animales con linfocitosis persistente, pero no se encontraron muestras que mantuvieran un recuento alto de linfocitos durante los 3 muestreos. Trece animales presentaron recuento de leucocitos totales elevados pero este se debió en 5 animales a una linfocitosis, en 4 animales a neutrofilias y en 4 animales tanto linfocitosis como neutrofilia. Estas no permanecieron en el tiempo y podrían explicarse por procesos inflamatorios concomitantes. Por lo tanto, no se detectaron animales con linfocitosis persistente, inhabilitándonos a realizar los grupos planteados en la metodología. Una posible causa es que los animales fueran aún muy jóvenes para desarrollar una linfocitosis persistente, dado que esta suele manifestarse en un 30% de los animales infectados y generalmente a partir de los 2-3 años de edad (OIE, 2008; Baruta et al., 2011). Para la detección de anticuerpos anti FMD se utilizaron 35 animales y se dividieron en 3 grupos según estatus serológico a BLV: 20 positivos, 10 negativos y 5 que seroconvirtieron durante el estudio. Todos los animales de cada grupo recibieron vacuna contra FMD (cepas A24/Cruzeiro y O1/Campos) al día 0 de acuerdo a la legislación nacional vigente. Las muestras de suero se obtuvieron los días 0, 15, 60, 165 y 300 postvacunación y se analizaron por LPBE para A24/Cruzeiro y ELISA de avidéz. La cinética para LPBE fue similar entre los 3 grupos hasta el día 300. Los anticuerpos aumentaron en todos los animales en forma significativa a los 15 días postvacunación ($p < 0,01$) y luego decayeron por debajo de los niveles protectores sugeridos para FMD (Maredei, et al., 2008). La diferencia de títulos por LPBE entre los grupos al día 15 pv no fue significativa ($p > 0,05$). Los índices de avidéz fueron comparados entre grupos y estos aumentaron a los 15 días postvacunación pero las diferencias no fueron significativas entre grupos. En cuanto a la respuesta de isotipos, considerando la inmunomodulación que causa el BLV en animales infectados, se determinaron los niveles de IgG1, IgG2 e IgM para A24/Cruzeiro en muestras de cada grupo. Se observó un aumento significativo de IgM a los 15 días postvacunación en todos los grupos. Este aumento fue significativo en los animales negativos a BLV ($p < 0,01$) en relación a los positivos. Los títulos de IgG1 también fueron mas altos en BLV negativos comparado con los positivos al día 15 posvacunación ($p < 0,01$). Sin embargo, los sucesivos muestreos no mostraron diferencia significativa. Finalmente, los títulos de IgG2 y su cinética fueron similares en todos los grupos. Se observaron títulos mas altos al día 15 postvacunación en animales negativos a BLV comparado con los positivos aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$). La respuesta inmune para FMD se evalúa por LPBE y se relacionan los títulos con niveles de protección, donde el Porcentaje de Protección Esperado (EPP) de 75% por LPBE se estima en un 1.90 para A24/Cruzeiro (Maradei et al., 2008; Robiolo et al., 2010). Todos los animales respondieron a la vacunación al día 15 con un título promedio de 1.76 y 2.12 en positivos y negativos respectivamente. A pesar de observarse una respuesta mayor en animales negativos, con títulos

superiores a EPP 75%, esta diferencia no fue significativa entre grupos ($p>0.05$). Luego de este periodo se observa una caída de anticuerpos al día 60 que se mantiene por debajo del 75% de EPP. En base a esto, una única dosis no es suficiente para mantener niveles aceptables de protección independientemente al estatus serológico.

En conclusión, los animales seronegativos a BLV lograron un título más alto contra FMD que los seropositivos a BLV, específicamente los isotipos IgG1 e IgM a los 15 días postvacunación ($p<0,05$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas a nivel de IgG2. Estos resultados concuerdan con nuestra hipótesis de que la inmunosupresión que sufren los animales asintomáticos infectados con el virus de leucosis bovina enzootica modifica la respuesta de los mismos ante la vacunación contra FMD.

- 5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).

Los resultados aún no han sido difundidos. Se está terminando de escribir y se enviará a *BMC Veterinary research*. Además se difundirán en eventos nacionales y regionales.

- 6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

No se pudo realizar el grupo de animales con linfocitosis persistente planteada originalmente, dado que no se obtuvieron animales con las características necesarias para realizar la clasificación. Sin embargo, el plan de trabajo pudo realizarse sin dificultades, comparando animales con y sin Leucosis, obteniéndose resultados claros en cuanto al efecto del virus en animales vacunados contra FMD. Similares resultados han obtenido en Estados Unidos (Erskine et al., 2011) asociando BLV y la vacunación contra *E. coli*.

En cuanto a la metodología empleada, a partir de la cooperación lograda con uno de los laboratorios de referencia para Fiebre Aftosa en Argentina (INTA - Casterlar) a principios de año, se pudo utilizar técnicas más precisas para la evaluación de la respuesta inmune y la valoración de la protección contra Fiebre Aftosa, según los estándares internacionales.

- 7) En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.

Consideramos que este programa es una buena oportunidad para comenzar a desarrollarse como investigador y abrir puertas a futuras investigaciones, así como nos permitió adquirir conocimientos y experiencia en el área de investigación y el área particular en el que decidimos trabajar.

- 8) **Resumen publicable de no más de 250 palabras** que sea accesible para un público amplio, y en un lenguaje dirigido a no especialistas en la temática de la investigación. En este resumen se debe dar cuenta de los objetivos del proyecto, los pasos seguidos para cumplirlos y los principales resultados alcanzados.

El resumen debe contener la siguiente información:

título del proyecto

servicio

nombre de los integrantes del equipo

nombre del docente orientador

Resumen publicable:

Interferencia de la Leucosis bovina enzoótica en la respuesta inmune de bovinos inmunizados contra Fiebre Aftosa a campo.

Área de Inmunología, Facultad de Veterinaria, UdelaR
Agustina Algorta, Rossina Popovich, Rodrigo Puentes (orientador).

Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa crónica e inmunosupresora causada por un retrovirus bovino. El virus de la fiebre aftosa (FMD) produce una enfermedad altamente contagiosa que afecta biungulados domésticos y salvajes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inmunosupresor del BLV en respuesta a la vacunación contra FMD en 35 vaquillonas Holando de aproximadamente 8 meses de edad. Se utilizó una vacuna bivalente en base oleosa y se obtuvieron muestras de suero al día 0, 15, 60, 165 y 300 postvacunación. Se detectaron los animales positivos a BLV mediante ELISA utilizando kit comercial y animales con linfocitosis persistente mediante hemograma. Se determinó el nivel de inmunoglobulinas totales producidas contra la cepa A24/Cruzeiro de la vacuna de Fiebre aftosa mediante Elisa en fase líquida y nivel de isotipos IgG1, IgG2, IgM e índice de avidéz mediante ELISA. Se obtuvo un pico de respuesta a los 15 días postvacunación. Los niveles de IgM e IgG1 anti FMD fueron significativamente menores en animales infectados con BLV ($p < 0.01$). En conclusión, las vaquillonas infectadas con BLV manifestaron una variación en la respuesta inmunológica frente a la vacunación obligatoria contra Fiebre Aftosa.

9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
1	Kit Elisa BLV IDEXX
100	Materiales de laboratorio: tips para micropipeta, gradillas, eppendorf, portaobjetos
100	Material para trabajo de campo: Jeringas de 10 ml para extracción de muestras, tubos sin anticoagulante, tubos con anticoagulante (EDTA)

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- 1) **Un CD con el informe final en formato .odt o .pdf. Y con el póster en su versión digital en formato .jpg o .pdf**
- 1) **Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)**



.....
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

Comentarios del docente orientador:

Las Brs. Algorta y Popovich se desempeñaron muy satisfactoriamente durante la ejecución de este proyecto. Demostraron gran interés por la actividad, con mucho entusiasmo y compromiso. La propuesta se basó en evaluar si los animales infectados con Leucosis bovina, responden inmunológicamente distinto cuando son vacunados contra Fiebre Aftosa. El trabajo se realizó en Uruguay, con la cooperación de INTA-Castelar-Argentina, donde se realizaron las pruebas para Fiebre Aftosa, con la capacitación de la Br. Algorta. Se pudo determinar que los animales infectados con Leucosis bovina, producen menos IgM e IgG1 cuando vacunados contra Fiebre Aftosa. Trabajos previos realizados en Estados Unidos, vacunando animales contra *E. coli* cuando estaban infectados con Leucosis, obtuvieron resultados similares, lo que demuestran junto con nuestros resultados, un compromiso del sistema inmune a nivel de la práctica veterinaria.

En conclusión, la financiación de este proyecto estudiantil, permitió abordar una temática muy importante no solo para nuestro país, y además aproximó en gran medida a las estudiantes involucradas al conocimiento científico y a la aplicación del método con una propuesta concreta que se realizó en tiempo y forma.

Valoro muy satisfactorio este programa de la CSIC, que permite incentivar a jóvenes a que conozcan de cerca la investigación que se realiza en la Universidad de la Republica, despertando el interés y la creatividad por la ciencia.



.....
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR

