



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-

OPCION: CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES.

TEMA: ALTERNATIVA INMUNOPROFILÁCTICA PARA LA BABESIOSIS
BOVINA: EVALUACIÓN DE UN NUEVO ADYUVANTE.

TUTOR EXTERNO: M.V. FADER FERNANDO WOLFGANG.

TUTOR INTERNO: Dra. LOZINA LAURA ANALÍA.

RESIDENTE: ALMIRÓN GUILLERMO GABRIEL.

E-mail: guillealmiron_92@hotmail.com

AÑO-2020

ÍNDICE

Resumen.....	Pág. 3
Introducción.....	Pág. 4
Objetivos.....	Pág. 9
Materiales y métodos.....	Pág. 9
Resultados y discusión.....	Pág. 12
Conclusión.....	Pág. 18
Bibliografía.....	Pág. 19
Anexos.....	Pág. 21

RESUMEN

Actualmente, para la profilaxis de la babesiosis bovina en Argentina solo se dispone de vacunas vivas en sus presentaciones frescas y congeladas. El presente trabajo, propone la evaluación de un nuevo adyuvante de uso en humanos, el Coa-ASC16 + eritrocitos deshidratados y parasitados con *Babesia bovis* y *B. bigemina* respectivamente en una concentración equivalente a 1×10^8 , como una nueva alternativa inmunoprolifáctica para la babesiosis bovina. Con tal fin se utilizaron 12 terneros susceptibles negativos a babesiosis, que fueron distribuidos en 4 grupos de 3 animales cada uno. El grupo GT3 inoculados con eritrocitos deshidratados parasitados con *B. bigemina* + adyuvante. El grupo GT2 inoculados con eritrocitos deshidratados parasitados con *B. bovis* + adyuvante. El grupo GT1 inoculado solo con adyuvante y el grupo GC sin inoculaciones. Se realizaron dos inoculaciones correspondientes a los días 0 y 15. Durante la prueba se efectuó el control de temperatura diariamente hasta el día 21 y luego cada 7 días, hematocrito y parasitemia cada 7 días, hemograma y bioquímica sérica los días 0, 15, 30, 45 y 60. Las muestras para ELISA se tomaron los días 30 y 60 post inoculación. Ningún animal presentó alteraciones relevantes tanto a nivel local como sistémico por lo tanto no requirieron tratamiento durante la prueba. La determinación de anticuerpos específicos para *Babesia spp.* en el día 30 fueron negativas a la presencia de la misma, en el día 60 del total de los animales analizados solo un 33% del GT3 presento anticuerpos específicos. Como conclusión se puede determinar con este trabajo, que no se pudo obtener la fórmula adecuada para lograr la respuesta humoral en todos los animales vacunados. Si bien el porcentaje de animales que produjeron anticuerpos es muy bajo, no es del todo desalentador ya que esta prueba es la primera que se realiza experimentalmente en veterinaria, el adyuvante por si solo y en combinación con el inmunógeno no produjo reacciones locales ni generales alentando así a posteriores pruebas con el fin de llegar a la fórmula adecuada.

INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria, causada por protozoarios de género *Babesia*, que afecta a los bovinos y cuyo agente etiológico, se encuentra representado por *Babesia bovis* y *B. bigemina*, consistiendo su principal sintomatología en fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia. La transmisión de esta enfermedad se produce a través de la garrapata común del bovino *Rhipicephalus microplus*. La importancia económica de la misma es grande, en los climas cálidos constituye una amenaza evidente en la producción bovina (SENASA, 2004).

Se han desarrollado diferentes pruebas serológicas para la detección de los anticuerpos contra *Babesia spp.*, las más utilizadas son el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), las inmunoenzimáticas (ELISA) como así también la prueba de fijación del complemento (OIE, 2004).

Sin embargo, el uso de títulos de anticuerpos como indicador directo de protección puede no ser apropiado (Echaide *et al.*, 1993). La respuesta de anticuerpos evaluada por la IFI y por la actividad de inhibición del crecimiento *in vitro* mostró que la seroconversión se correlaciona con la actividad de neutralización *in vitro*, pero no con la inmunidad protectora *in vivo* (Fish *et al.*, 2008).

La resistencia a padecer babesiosis clínica en adultos, dependerá de la inmunidad adquirida después de la infección natural antes de los 12 meses de edad o de la vacunación con cepas vacunales de escasa patogenicidad (Martínez, 2014). La forma más adecuada de prevenir esta enfermedad es erradicar la garrapata de los establecimientos. Sin embargo, la erradicación del vector muchas veces es inviable y los tratamientos quimioterápicos para la tristeza parasitaria por si solos no evitan las pérdidas productivas causadas por esta enfermedad (Miraballes *et al.*, 2018). En estas condiciones, es necesario el monitoreo de los títulos de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina*, seguida de la vacunación cuando estos son bajos. Asimismo, la vacunación es necesaria cuando se trasladan animales de zonas libres de garrapatas a zonas endémicas (Florin-Christensen *et al.*, 2014).

A nivel comercial, en la profilaxis para la babesiosis bovina se utilizan vacunas con cepas vivas o atenuadas. La producción conlleva la infección de terneros con cepas seleccionadas, y el uso de sangre como vacuna. Los terneros deben estar libres de agentes infecciosos que puedan ser transmitidos por su sangre. También se han utilizado los métodos de cultivo *in vitro* para producir parásitos para vacuna. El método más seguro para reducir la virulencia de *B. bovis* es por medio de pasajes rápidos a través de

terneros esplenectomizados susceptible, a diferencia de *B. bigemina* donde la virulencia disminuye durante la permanencia prolongada del parásito en animales con la infección latente. Las vacunas pueden prepararse en forma congelada o en forma refrigerada. Es preferible la vacuna en forma congelada ya que permite un control riguroso de post producción de cada lote. Sin embargo, es más costosa de producir y más difícil de transportar (por su forma de conservación en nitrógeno líquido), que la vacuna refrigerada. Las vacunas vivas no son completamente seguras (OIE, 2004).

Una presentación innovadora es la vacuna muerta o inactivada, a base de sobrenadantes de cultivo *in vitro*, conteniendo exoantígenos de *B. bovis* y *B. bigemina* presentándose en forma liofilizada más el agregado de un adyuvante. Algunos autores comprobaron que estos tipos de vacunas producen una respuesta protectora, resultando de interés la utilización de los mismos como alternativa profiláctica (Montenegro-James *et al.*, 1987; Fish *et al.*, 2008; Patarroyo *et al.*, 1995); Sin embargo, existen estudios que demuestran que la utilización de vacunas muertas a base de exoantígenos no produce protección frente a la enfermedad (Echaide *et al.*, 1993).

Como ventajas, las vacunas muertas son más seguras, los animales inmunosuprimidos no enferman, no existe riesgo de diseminación, libres de patógenos residuales y poseen condiciones menos exigentes de conservación. Como desventajas poseen el riesgo de alterar el inmunógeno protector, baja inmunogenicidad, se requieren varias dosis, necesitan adyuvantes, lenta respuesta inmune, protección incompleta y protección de corta duración (Mortola *et al.*, 2018).

En la actualidad, para la inmunoprofilaxis de la babesiosis bovina, sólo se disponen vacunas vivas en las presentaciones fresca y congelada. Otra presentación, en forma deshidratada y a base de sobrenadante de cultivos *in vitro* de *B. canis* y *B. rossi*, incorporando saponina como coadyuvante, se encuentra disponible comercialmente para la profilaxis de la babesiosis canina, EURICAN® PIRO, la cual provee una inmunidad de 6 meses de duración.

Actualmente el concepto de adyuvante es muy amplio y se considera que son componentes capaces de mejorar, organizar o “dar forma” a la respuesta inmune desencadenada por el antígeno co-administrado (Reed *et al.*, 2013). Algunos autores consideran que los mismos, son sustancias que, utilizadas en combinación con un antígeno específico, producen una respuesta inmune más robusta que el inmunógeno sólo (Ramón, 1924). Para otros son preparados químicos, que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune y que con

su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Morris Quevedo, 1999).

Existen numerosas clasificaciones, aunque la más usada es aquella según su mecanismo de acción (Tizar, 2009) aunque estos son todavía poco conocidos. Sin embargo, en general pueden actuar por alguno de estos mecanismos:

1- Adyuvantes de liberación prolongada: estos retrasan la eliminación del antígeno, permitiendo que la respuesta inmune dure más tiempo, por ejemplo, las sales de aluminio. Cuando un antígeno se mezcla con esta sal y se inyecta en un animal, se forma un granuloma rico en macrófagos en el sitio de inoculación. El antígeno contenido en este granuloma se filtra lentamente en el organismo proporcionando un estímulo antigénico prolongado. Otro ejemplo es el adyuvante incompleto de Freud, es una emulsión de agua en aceite, que estimula una respuesta inflamatoria local crónica formando un granuloma o un absceso de modo que el antígeno se filtra lentamente desde la fase acuosa de la emulsión, este daño puede promover la respuesta inmune, ya que la inflamación y la necrosis celular estimulan a las células dendríticas y a los macrófagos.

2- Adyuvantes particulados: están diseñados para liberar el antígeno de manera eficaz a las células presentadoras de antígenos, por las que son fácilmente endocitadas, ya que tienen un tamaño similar a las bacterias. Las micropartículas biodegradables que incorporan antígenos normalmente se diseñan para ser fácilmente fagocitadas. En este grupo se encuentran liposomas, emulsiones, micropartículas y complejos inmunoestimulantes (ISCOM).

3- Adyuvantes inmunoestimulantes: estos adyuvantes ejercen sus efectos promoviendo la producción de citoquinas. Como resultado activan a las células dendríticas y a los macrófagos. Esas citoquinas a su vez promueven la respuesta de los linfocitos T colaboradores y dirigen y focalizan las respuestas inmunes adquiridas, dependiendo del producto microbiano específico pueden incrementar las respuestas Th1 (fuerte inmunidad celular y una débil y transitoria respuesta humoral, inducida por patógenos intracelulares) o Th2 (otorgan inmunidad humoral, producen IgE, eosinófilos y mastocitos, la respuesta de este tipo es inducida por patógenos extracelulares) (Rojas *et al.*, 2010). Como ejemplo se encuentra la saponina, tienen tanto efecto tóxico como actividades adyuvantes, aunque se puede separar las fracciones responsables de ambos efectos. Estimulan selectivamente la respuesta de tipo Th1. Usado para la babesiosis canina, la saponina produce una inflamación difusa y/o nódulo endurecido acompañado

de dolor en el lugar de inoculación (EURICAN® PIRO), también se utiliza en las vacunas del carbunco bacteridiano y de la fiebre aftosa.

4- Adyuvantes combinados: se pueden construir adyuvantes muy potentes combinando un adyuvante particulado o uno de liberación prolongada con un agente inmunoestimulante. Por ejemplo, se puede mezclar un adyuvante de liberación prolongada oleoso con micobacterias inactivadas incorporadas en la emulsión de agua en aceite, denominándose esta mezcla como adyuvante completo de Freud (FCA). La ventaja del FCA es la excelente respuesta inmune que induce, pero también representa desventaja al inducir importantes reacciones adversas además de una sensibilización específica hacia el bacilo tuberculoso. Al ser una sustancia oleosa su uso en animales de consumo es problemática ya que puede estropear la carne. El FCA está casi restringido a la primera y única inoculación en planes de hiperinmunización. Otro ejemplo son los ISCOM son complejos estables que contienen colesterol, fosfolípidos, saponina y antígeno. Estos ISCOM son adyuvantes eficientes con pocos efectos secundarios. Su principal inconveniente es la dificultad para incluir antígeno en el interior del sistema adyuvante. En función del antígeno empleado pueden estimular las respuestas Th1 o las Th2 (Tizar, 2009).

Al parecer, con los antígenos de *B. bovis* y *B. divergens*, el FCA no es tan efectivo como la saponina. Se demostró que el uso de Quil A saponina brinda una buena protección. Esto se ha demostrado para tres especies diferentes de *Babesia*. Usando ADN recombinante fusionada a proteínas de *B. bovis* se encontró que la Quil A saponina inducía niveles más fuertes de protección que el FCA o la saponina de grado comercial. Una ventaja adicional del uso de saponina es que las reacciones localizadas tras la vacunación son aceptables, en contraste con los observados con adyuvantes a base de aceite como el FCA (Montenegro-James, 1995).

En el momento de la selección del adyuvante y formulación de una vacuna se deben tener en cuenta varios parámetros, tales como: la naturaleza física y química del antígeno, el tipo de respuesta inmune deseada, el promedio de edad de la población a la cual va dirigida y la vía de administración. Las cualidades deseadas para cada vacuna en particular pueden requerir adyuvantes con propiedades específicas (Sánchez Vallecillo, 2014). Con fines investigativos, las exigencias más importantes se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y, por supuesto, la disponibilidad comercial (Morris Quevedo, 1999).

En este trabajo de tesis se utilizó como una nueva alternativa inmunoproláctica para la babesiosis bovina, un adyuvante formulado para su uso en humanos, desarrollado por investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (FCQ-UNC), se trata de una nueva estrategia formulado con Coa-ASC16, es una nanoestructura que se forma por autoensamble del palmitato de ascorbilo (ASC16). Como parte de su mecanismo de acción, proporciona *depot* (liberación sostenida en el tiempo) del antígeno in vivo e induce respuesta inflamatoria local per se. Ofrece varias ventajas como biomaterial: a) sus componentes son biodegradables; b) la vitamina C del 6-O-palmitato de ascorbilo conserva sus propiedades antioxidantes; c) dispone de una estructura apropiada para transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas; d) es bien tolerado; e) es fácil de producir a gran escala y bajo costo. Esta estrategia adyuvante ha sido evaluada con buenos resultados en ratones de experimentación utilizando antígeno proteico pero todavía no se realizaron pruebas en otros animales. El ASC16 en la actualidad es utilizado sólo o en combinación con alfa-tocoferoles como estabilizantes para aceites, en formulaciones farmacéuticas orales y productos alimenticios (Sánchez Vallecillo, 2014).

OBJETIVOS

General:

- Evaluar la respuesta humoral y la respuesta clínica de una formulación para la profilaxis de la babesiosis bovina.

Particulares:

- Evaluar efectos adversos en el adyuvante incorporado.
- Determinar títulos de anticuerpos contra *Babesia spp.*
- Evaluar respuesta clínica en animales inoculados.

Hipótesis: una presentación de la vacuna para la babesiosis bovina en forma deshidratada y asociada a un adyuvante, induce a una respuesta de tipo humoral contra *Babesia bovis* y *B. bigemina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio: este trabajo se llevó a cabo en la “Estancia San Lorenzo” ubicada en la localidad de Felipe Yofre, departamento de Mercedes, provincia de Corrientes.

Animales: se utilizaron n=12 terneros de entre 8 y 10 meses de edad, provenientes de un establecimiento libre de garrapatas, con serología negativa a babesiosis. Se buscó que los mismos presenten características homogéneas, misma raza (tipo Braford) y rango de pesos, mismo lote, nacidos en el establecimiento.

Manejo Sanitario: el establecimiento realiza un manejo sanitario de rutina utilizando vacunas contra carbunco, policlostridiales, botulismo, IBR-DVB y leptospirosis. El control del vector *R. microplus* en el establecimiento se realiza mediante baños de inmersión con Amidinas y lactonas macrocíclicas por vía sistémica. Los animales fueron sometidos a un control coproparasitológico, que reveló una baja carga parasitaria sin necesidad de tratamientos.

Formulación de la vacuna: los eritrocitos altamente parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina* deshidratados, fueron proporcionados por el equipo de investigación de la cátedra de Farmacología y Toxicología de la FCV-UNNE. La composición del adyuvante (Coa-ASC16) fue proporcionada por investigadores de la FCQ-UNC. La puesta a punto y el ajuste del ensamblado del adyuvante y el antígeno se realizó en la cátedra de Farmacología y Toxicología. Las muestras fueron preparadas mediante la mezcla de los componentes en proporciones adecuadas en tubos herméticamente

cerrados, para lo cual se inició pesando el paquete globular deshidratado parasitado con *B. bovis* y *B. bigemina* por separados, en una concentración equivalente a 1×10^8 (100.000.000) eritrocitos parasitados. El adyuvante, que inicialmente se encontraba deshidratado, también fue pesado (40 mg/dosis) e incorporado, junto con el diluyente dextrosa al 2 %. Estas dispersiones fueron homogeneizadas en vortex y luego fueron calentadas a 80°C en un baño maría, hasta alcanzar la temperatura micelar crítica (TMC) y nuevamente homogeneizadas en vortex. Finalmente, se las dejó en reposo hasta tomar temperatura ambiente, momento en el cual se produce el ensamblado del adyuvante incorporando el antígeno. Asimismo, se formularon tubos conteniendo solo adyuvante que actuaron de control.

Protocolo de Inoculación: Se llevaron a cabo dos inoculaciones por vía subcutánea, los días 0 y 15 respectivamente, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de la siguiente manera:

- Grupo Control (GC): n=3 terneros sin inocular.
- Grupo Tratado 1 (GT1): n= 3 terneros inoculados con Coa-ASC16.
- Grupo Tratado 2 (GT2): n= 3 terneros inoculados con eritrocitos deshidratados, parasitados con *B. bovis* + Coa-ASC16.
- Grupo Tratado 3 (GT3): n= 3 terneros inoculados con eritrocitos deshidratados, parasitados con *B. bigemina* + Coa-ASC16.

Control Diario a Terneros: A partir de la inoculación, los terneros fueron inspeccionados diariamente para evaluar su estado de salud realizando los siguientes controles:

- Evaluación de reacción local en sitio de inoculación.
- Determinación de temperatura rectal: diariamente hasta el día 21, luego cada 7 días hasta finalizar el ensayo.
- Hematocrito: se realizó la lectura del microhematocrito cada 7 días.
- Observación de frotis sanguíneo (extendido y gota gruesa) al microscopio óptico, cada 7 días.
- Hemograma completo y bioquímica sérica (cada 15 días, se realizó en el laboratorio del Hospital de Clínica de Pequeños Animales de la FCV-UNNE).

Control de respuesta inmunogénica: Se realizaron controles a los 30 y 60 días post-inoculación mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) para comprobar la respuesta humoral. Estas muestras fueron procesadas por la Estación Experimental de INTA – Rafaela. El día 30 se llevó a cabo el análisis correspondiente a los animales de todos los

grupos, luego para el día 60 solamente se analizaron los animales del grupo GT2 y GT3 ya que estos eran los únicos grupos en los que se inocularon con *Babesia spp.*

Registros: la recolección de datos se anotó en planillas correspondientes para su mejor comprensión y seguimiento.

Análisis estadístico: El análisis de los datos se realizó utilizando el programa Infostat/profesional versión 2006. Los cálculos de la estadística descriptiva fueron presentados en tablas conteniendo la media y el desvío estándar (DE) de los datos evaluados, así como también, el análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias por el test de Tukey utilizando un $P=0,05$. Todos los resultados se presentaron por medio de Tablas y Gráficos.

Materiales y equipos necesarios para la prueba: jeringas de 5 ml, agujas 40/12 y 25/8, portaobjetos, giemsa, metanol, agua destilada/PBS, capilares para microhematocrito, plastilina, tubos Corning, tubos Khan, pipetas Pasteur, gradillas, guantes, algodón, alcohol, citrato de sodio, heparina, tubos para sangre, conservadora, frío-Pack, termómetro, fonendoscopio, regla, lavandina, sogas, baño maría, balanza analítica, flujo laminar, microscopio óptico, centrífuga, ábaco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación: en el presente trabajo se logró la formulación del inmunógeno, a partir de la incorporación del paquete globular deshidratado al adyuvante Coa-ASC16 evidenciándose la formación de un gel homogéneo, de consistencia semisólida, firme y de una coloración marrón clara. La característica de viscosidad de la formulación permitió una adecuada aplicación por vía subcutánea.

Reacciones locales: a partir del seguimiento diario de los terneros, se observó ausencia de reacciones tisulares locales en todos los grupos, sin presencia de inflamación, enrojecimiento, aumento de temperatura local o abscesos.

Esto se contrasta con lo descrito por Sánchez Vallecillo *et al.*, 2014 quién obtuvo una respuesta inflamatoria local cuando administro el mismo adyuvante, en forma subcutánea a ratones de experimentación.

Temperatura: los animales monitoreados no presentaron fiebre, todos se mantuvieron con valores dentro del rango considerado normal. En el cuadro 1, se puede apreciar las medias con sus DE para el GC fue de $38,9^{\circ}\text{C} \pm 0,28$; GT1 $38,8^{\circ}\text{C} \pm 0,3$; GT2 $38,8^{\circ}\text{C} \pm 0,35$ y GT3 $38,9^{\circ}\text{C} \pm 0,33$ evidenciando que la temperatura nunca superó los $39,5^{\circ}\text{C}$ en ninguno de los grupos, valor tomado como indicador de fiebre.

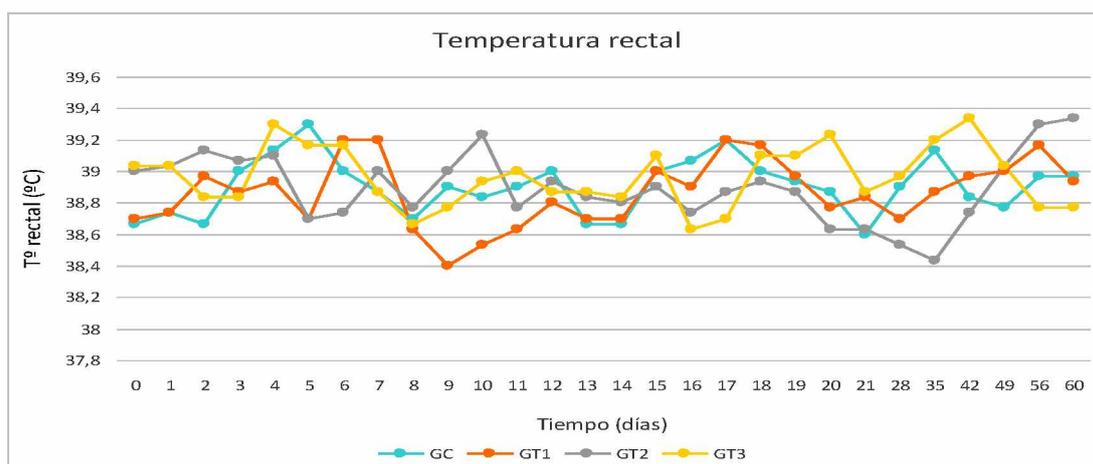
Cuadro 1: medias con sus DE para la variable temperatura ($^{\circ}\text{C}$) por grupos.

	GC	GT1	GT2	GT3
Media	38,9	38,8	38,8	38,9
DE	$\pm 0,28$	$\pm 0,3$	$\pm 0,35$	$\pm 0,33$

Estos resultados coinciden con los expuestos por Fish *et al.*, 2008 quien obtuvo medias de $38,9^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ en bovinos vacunados con vacuna muerta a base de exoantígenos de *B. bovis* mas saponina como adyuvante.

Para una mejor comprensión de las variaciones diarias que se obtuvieron en la medición de la temperatura se puede observar el gráfico 1, en el cuál se plasman los valores obtenidos diariamente hasta el día 21 y luego cada 7 días, hasta el día 60 post vacunación.

Gráfico 1: medias de temperatura (°C) por grupos y por día.



En la tabla 1, se realizó la comparación de las medias de los grupos, por medio del test de Tukey y ANOVA el cual evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas en los diferentes grupos.

Tabla 1: ANOVA y test de Tukey para las medias de temperatura (°C) por grupos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Temp	112	0,32	0,06	0,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,42	30	0,05	1,24	0,2204
Dias	1,28	27	0,05	1,24	0,2303
Grupo	0,15	3	0,05	1,28	0,2856
Error	3,10	81	0,04		
Total	4,52	111			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13706

Error: 0,0382 gl: 81

Grupo	Medias	n	E.E.
2	38,86	28	0,04 A
3	38,89	28	0,04 A
1	38,90	28	0,04 A
4	38,96	28	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

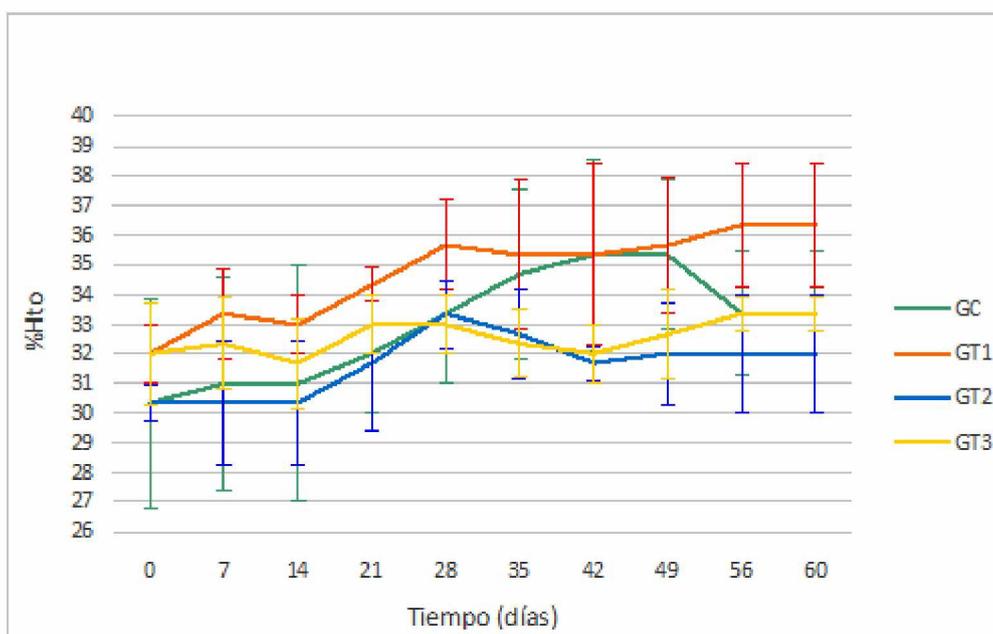
Hematocrito (%): los resultados obtenidos por la técnica de microhematocrito en los días analizados, evidenciaron que ningún animal presentó anemia y siempre se mantuvieron con valores dentro del rango normal. En el cuadro 2 se encuentran las medias con sus DE para el GC fue de 32,9% ± 2,82; GT1 34,7% ± 1,76; GT2 31,6% ± 1,6 y GT3 32,57% ± 0,16, en el cual puede observarse que el hematocrito no desciende por debajo de 24% en ninguno de ellos, valor tomado como indicador de anemia.

Cuadro 2: medias con sus DE para la variable Hematocrito (%) por grupos.

	GC	GT1	GT2	GT3
Media	32,9	34,7	31,6	32,57
DE	±2,82	±1,76	±1,6	±0,16

Para una mejor comprensión de las variaciones diarias que se obtuvieron en la medición del hematocrito, se puede observar el gráfico 2, en el cuál se plasman las variaciones de las medias con sus DE que se obtuvieron semanalmente.

Gráfico 2: medias y DE de Hematocrito (%) por grupos y por día.



En la tabla 2, se realizó la comparación de las medias de los grupos, por medio del test de Tukey y ANOVA el cual evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esto no tiene una importancia clínica, debido a que el rango fisiológico de hematocrito (24-46%) es muy amplio y los animales a lo largo de la prueba tuvieron valores extremos, pero siempre dentro del rango fisiológico.

Tabla 2: ANOVA y test de Tukey para las medias de hematocrito (%) por grupos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Hto	40	0,84	0,77	2,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	102,13	12	8,51	11,85	<0,0001
Grupo	54,30	3	18,10	25,19	<0,0001
Día	47,84	9	5,32	7,40	<0,0001
Error	19,40	27	0,72		
Total	121,53	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,03731

Error: 0,7184 gl: 27

Grupo	Medias	n	E.E.	
3	31,50	10	0,27	A
4	32,57	10	0,27	B
1	32,97	10	0,27	B
2	34,73	10	0,27	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Parasitemia (%): en los frotis sanguíneos (extendido y gota gruesa) teñidos con Giemsa y observados al microscopio óptico no se pudo evidenciar la presencia de hemoparásitos en estudio. Esto pudo deberse a que el hemoparásito puede no ser viable, ya que sufrió un considerable estrés térmico, primero durante el proceso de deshidratación por medio de frío y luego en el proceso de ensamblado con el adyuvante a través de calor.

Varios autores, Echaide *et al.*, 1993; Fish *et al.*, 2008; Patarroyo *et al.*, 1995 y Montenegro-James *et al.*, 1987 registran en sus trabajos que al utilizarse vacunas muertas o sobrenadantes con exoantígenos, las mismas no producen reacciones en el organismo, como: fiebre, disminución del hematocrito o parasitemia, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo.

Hemograma: en el hemograma completo se analizó glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb), recuento total de blancos (GB), fórmula leucocitaria absoluta: Neutrófilos (N), Linfocitos (L), Monocitos (M), Eosinófilos (E) y Basófilos (B) y plaquetas. Se evidenció una leucocitosis, neutrofilia moderada y una monocitosis indicando la presencia de un proceso inflamatorio agudo en los grupos GT2 y GT3 hacia el final de la prueba, en el grupo GT1 se produjo una neutrofilia, la cual pudo deberse a la estimulación del adyuvante, paralelamente el GC también sufrió alteraciones del leucograma que indican procesos inflamatorios agudos (anexo I). Si bien la vacuna produjo alteraciones en el leucograma que pueden indicar un aumento en

la migración de células blancas, no se puede afirmar que se inició una respuesta inmunitaria de tipo celular, para ello sería necesario realizar pruebas más específicas.

Bioquímica Sérica: se evaluaron proteínas totales (PT) y albúmina (Alb), así como también la relación albúmina/globulina (A/G). En el cuadro 3 se encuentran las medias y el DE para las variables PT, Alb y A/G por grupo en los días 0, 15, 30, 45 y 60 post vacunación. Se puede evidenciar una hipoproteinemia de los animales al inicio del ensayo, que luego va asimilándose más a lo normal, así como la relación A/G que al final de la prueba se encuentra dentro de los rangos normales. Esto puede deberse a que los animales no estaban siendo suplementados al inicio del ensayo y luego por cuestiones de manejo fueron trasladados a un potrero con una pastura de mayor calidad. Los valores de referencia considerados como normales fueron los siguientes: PT: 6,8-8,6 g/dl; Alb: 3-4,3 g/dl; A/G: 0,84-0,94, Smith, 2010.

Cuadro 3: medias y DE para las variables PT, Alb y A/G por grupo en los días 0, 15, 30, 45 y 60 post vacunación.

		GC	GT1	GT2	GT3
Día 0	PT (g/dl)	5,6 ± 0,41	6,1 ± 0,73	6,8 ± 0,6	6,4 ± 0,4
	Alb (g/dl)	2,6 ± 0,26	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,05	2,5 ± 0,2
	A/G	0,86	0,79	0,7	0,64
Día 15	PT (g/dl)	5,7 ± 0,36	6,2 ± 0,66	6,8 ± 0,51	5,7 ± 0,36
	Alb (g/dl)	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,15	2,5 ± 0,2
	A/G	0,78	0,72	0,65	0,78
Día 30	PT (g/dl)	6,6 ± 0,17	6,6 ± 0,45	6,7 ± 0,25	6,6 ± 0,23
	Alb (g/dl)	3,4 ± 0,15	3,3 ± 0,15	3,5 ± 0,10	3,1 ± 0,15
	A/G	1,06	1	1,09	0,88
Día 45	PT (g/dl)	7,3 ± 0,4	7,3 ± 0,62	6,5 ± 0,30	7,8 ± 0,66
	Alb (g/dl)	3,2 ± 0,05	3,1 ± 0,40	3,1 ± 0,26	3,2 ± 0,26
	A/G	0,78	0,73	0,91	0,69
Día 60	PT (g/dl)	5,8 ± 0,20	5,6 ± 0,35	5,5 ± 0,47	5,7 ± 0,26
	Alb (g/dl)	2,7 ± 0,15	2,7 ± 0,10	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,11
	A/G	0,87	0,93	0,96	0,83

Respuesta Inmunogénica: los resultados de los ELISA se muestran en los protocolos remitidos por el INTA-Rafaela (Anexo II). Al inicio de la experiencia, los animales, muestreados al día 0 resultaron negativos a la presencia de anticuerpos contra *Babesia spp.* A los 30 días post inoculación, el análisis serológico resultó negativo para todos los grupos (Anexo II-Nº de protocolo H19-0335). Sin embargo, al día 60, el 33% de los animales del grupo GT3 (inoculado con eritrocitos parasitados con *B. bigemina* +

Coa-ASC16), presentó anticuerpos frente a este hemoparásito, manteniéndose los demás grupos negativos (Anexo II-Nº de protocolo H19-0385).

Estos resultados obtenidos no coinciden con aquellos publicados por Echaide *et al.*, 1993; Fish *et al.*, 2008; Patarroyo *et al.*, 1995 y Montenegro-James *et al.*, 1987 quienes al utilizar vacunas con exoantígenos más Quil A saponina como adyuvante, sí obtuvieron una respuesta inmunitaria de tipo humoral en todos los bovinos vacunados. A excepción de Echaide *et al.*, 1993 todos los autores informaron el logro de una respuesta protectora luego del desafío con una cepa heteróloga patógena.

CONCLUSIÓN

A partir del presente trabajo, se pudo demostrar que la nueva alternativa adyuvante Coa-ASC16 no presentó ningún tipo de reacción local ni sistémica indeseable. Teniendo en cuenta sus características y su accesible valor en el mercado puede utilizarse en la incorporación con vacunas muertas sin ningún riesgo y en forma segura.

Con respecto a la vacuna preparada, tampoco se evidenciaron signos o síntomas adversos, como reacciones a nivel del sitio de inoculación, hipertermia o parasitemia por lo que no hubo necesidad de tratamiento médico.

En cuanto a la respuesta inmunogénica y como conclusión final, en este trabajo no se pudo obtener una fórmula que logre una respuesta humoral en todos los animales vacunados. De los 6 individuos vacunados con hemoparásitos (GT2 y GT3) solo un animal presento anticuerpos específicos contra *B. bigemina*, si bien el resultado es muy bajo, no es del todo desalentador ya que, si un animal pudo reaccionar a la vacuna presentando títulos de anticuerpos específicos para ese hemoparásito, demuestra el poder antigénico de la misma. Debemos tener en cuenta que esta alternativa inmunoproláctica es totalmente nueva, y todavía está en las primeras fases de su investigación y experimentación en bovinos, ya que fue formulada para humanos y hasta la fecha, solo experimentada en ratones.

Se recomienda antes de rechazar por completo la eficacia del nuevo adyuvante, realizar más pruebas ajustando la dosis inoculada hasta llegar con la dosis efectiva. Realizar la inoculación del paquete globular parasitado solo, sin adyuvante, para confirmar su uso como inmunógeno, ya que puede ser que, en el proceso de deshidratación por liofilización se haya producido una inactivación excesiva, ocasionando alteraciones propias del inmunógeno y esenciales para engendrar una correcta respuesta inmune. Realizar la detección de una respuesta del tipo celular y no solo del tipo humoral, ya que al ser un parasito intraeritrocitario la activación de células como una respuesta inmunitaria también podría verse involucrada. Y por último hacer un desafío a los animales con cepas de campo heterólogas a las usadas, para confirmar la respuesta protectora.

BIBLIOGRAFÍA

- ECHAIDE, L. E; DE ECHAIDE, S. T; GUGLIELMONE, A. A. 1993. Live and soluble antigens protection to *Babesia bigemina*. Veterinary parasitology. 51, 35-40.
- EURICAN® PIRO: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nobivac-piro-epar-product-information_es-0.pdf.
- FISH, L; LEIBOVICH, B; KRIGEL, Y; McELWAIN, T; SHKAP, V. 2008. Vaccination of cattle against *B. bovis* infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. Vaccine. 26, 29-33.
- FLORIN-CHRISTENSEN, M; SUAREZ, C. E; RODRIGUEZ, A. E; FLORES, D. A; SCHNITTGER, L. 2014. Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. Parasitology 141, 1563–1592.
- MARTÍNEZ, I; JACOBO, R; CIPOLINI, F; MARTINEZ, D; STORANI, C; RAGAZZI, A; ECHAIDE, I; TORIONI DE ECHAIDE, S. 2014. Estudio prospectivo de las primo infecciones por *Babesia bovis* en terneros *Brahman* y *Brangus* de un área enzoótica de Corrientes, Argentina. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 13, 41-47.
- MIRABALLES, C; LARA, S; LORENZELLI, E; LEMOS, E; CORREA, F. 2018. Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria bovina. Revista Veterinaria Uruguay. 54. 209, 9-13.
- MONTENEGRO-JAMES, S; TORO BENITEZ, M; LEÓN, M; LOPÉZ, R; RISTIC, M. 1987. Bovine babesiosis: induction of protective immunitiy with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. Parasitology Research. 74, 142-150.
- MONTENEGRO-JAMES, S. 1995. Vaccines against babesiosis using soluble parasite antigens. Parasitology Today. 11. 12, 456-461.
- MORRIS QUEVEDO, A. J; MANRIQUE, M. C; DÍAZ, T. R; DENIA CAMPOS, O. 1999. Adyuvantes inmunológicos. Rev. Cuvana Investigation Biomédic. 18. 2, 25-42.
- MORTOLA, E; LARSEN, A; MICELI, G. 2018. Vacunas en Rumiantes Domésticos. 1ra edición. Editorial de la Universidad de la Plata. La Plata Argentina. 11-12.
- OIE. 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 5ta Edición. 2.3.8, 548-557.

- PATARROYO, J. H; PRATES, A. A; TAVARES, C. A. P; MAFRA, C. L; VARGAS, M. I. 1995. Exoantigens of attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 59, 189-199.
- RAMÓN, G. 1924. Sur la toxine et surranatoxinediphtheriques. *Annales Institutet Pasteur*. 38, 1-3.
- REED, S. G; ORR, M. T; FOX, C. B. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*. Dec. 19. 12, 597-608.
- ROJAS, M. W; ANAYA, C. J. M; ARISTIZÁBAL, B. B; CANO, R. L. E; GOMEZ, O. L. M; LOPERA, H. D. 2010. *Inmunología de rojas*. 15a Edición. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín Colombia. 138-139.
- SÁNCHEZ VALLECILLO, M. F. 2014. *Vacunas: Nanoestructura de tipo cristal líquido como sistema portador del adyuvante CpG-ODN para la inducción de una respuesta inmune*. Tesis Doctoral- Facultad de Ciencias Químicas- Universidad Nacional de Córdoba.
- SENASA. 2004. *Manual de Procedimientos/Anaplasmosis y babesiosis*. 29, 16-17:http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/29%20Anaplasmosis.pdf
- SMITH, B. P. 2010. *Medicina interna de grandes animales*. 4ta Edición. Gea Consultoría Editorial S. L. España. 401-406.
- TIZAR, I. R. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8VA edición. Diorki Servicios Integrales de Edición. Barcelona España. 350-354.

ANEXO I

Hemograma: se observan los valores que arrojó el hemograma realizado para los días 0, 15, 30, 45 y 60 post vacunación. Este estudio se realizó en el laboratorio del Hospital de Clínica de Pequeños Animales de la FCV-UNNE. Se evidenció una leucocitosis, neutrofilia moderada y una monocitosis en los grupos GT2 y GT3 indicando la presencia de un proceso inflamatorio agudo, en el grupo GT1 se produjo una neutrofilia, la cual pudo deberse a la estimulación del adyuvante, paralelamente el GC también sufrió alteraciones del leucograma que indican procesos inflamatorios agudos. Si bien la vacuna produjo alteraciones en el leucograma que pueden indicar un aumento en la migración de células blancas, no se puede afirmar que se inició una respuesta inmunitaria de tipo celular, para ello sería necesario realizar pruebas más específicas. Las celdas en rojo indican un valor superior a lo normal y las celdas en verde indican un valor inferior a lo normal.

Parámetros fisiológicos tomados como referencia (Smith, 2010):

Hematocrito (Hto)	24 - 46 %
Glóbulos Rojos (GR)	5.000.000 - 10.000.000/mm ³
Hemoglobina (Hb)	8 - 15 g/dl
Glóbulos Blancos (GB)	4.000 - 12.000 /mm ³
Neutrófilos (N)	600 - 4.000 /mm ³
Linfocitos (L)	2.500 - 7.500 /mm ³
Monocitos (M)	25 - 840 /mm ³
Eosinófilos (E)	0 - 24.000 /mm ³
Basófilos (B)	0 - 200 /mm ³
Plaquetas	100.000 - 800.000/mm ³

Día 0	11-oct									
Caravana	Hto	GR	Hb	GB	N	L	M	E	B	Plaquetas
GC										
16	27	7.300.000	9,1	7.500	2.400	4.575	450	75	0	607.000
970	30	6.950.000	8,6	8.500	3.315	4.505	680	0	0	647.000
985	34	6.930.000	9,5	11.300	3.955	6.441	791	113	0	629.000
GT1										
940	33	7.350.000	9,7	7.000	2.310	4.200	350	140	0	522.000
959	32	6.970.000	8,2	6.800	3.128	3.332	340	0	0	447.000
966	31	8.070.000	10,1	9.500	3.230	5510	760	0	0	281.000
GT2										
960	31	8.000.000	8,5	10.700	3.959	5.885	749	107	0	345.000
965	30	6.120.000	8,3	5.900	2.360	3.127	354	59	0	291.000
18	30	6.930.000	9,6	8.400	2.688	5.124	420	168	0	409.000
GT3										
988	33	7.250.000	8,9	10.500	3.885	6.090	525	0	0	526.000
17	30	7.080.000	8,5	7.600	2.812	4.332	456	0	0	490.800
983	33	7.090.000	9,1	9.100	3.913	4.277	819	91	0	390.000

Día 15	28-oct									
Caravana	Hto	GR	Hb	GB	N	L	M	E	B	Plaquetas
GC										
16	27	6.940.000	8,3	7.200	2.160	4.382	504	144	0	534.000
970	31	6.860.000	9,2	8.500	2.465	5.355	595	85	0	485.000
985	35	6.868.000	10,4	11.100	5.550	4.773	666	111	0	535.000
GT1										
940	34	6.930.000	9,8	6.900	2.208	4.209	483	0	0	712.000
959	32	6.770.000	9,7	6.400	1.856	4.096	384	64	0	398.000
966	32	7.720.000	9,4	9.100	3.822	4.641	546	91	0	536.000
GT2										
960	32	7.580.000	9,3	10.500	4.935	4.830	630	105	0	609.000
965	28	5.980.000	9	5.800	2.552	2.784	464	0	0	522.000
18	31	6.880.000	9,2	7.300	3.577	3.139	511	73	0	447.000
GT3										
988	33	7.440.000	9,8	12.100	4.961	6.534	605	0	0	607.000
17	30	7.170.000	9,1	6.800	2.720	3.604	408	68	0	647.000
983	32	7.110.000	9,7	8.000	4.240	3.280	400	80	0	629.000

Día 30	11-nov									
Caravana	Hto	GR	Hb	GB	N	L	M	E	B	Plaquetas
GC										
16	32	8.030.000	9,6	7.500	2.775	4.125	600	0	0	620.000
970	32	7.090.000	9,5	10.700	3.531	6.527	642	0	0	467.000
985	36	7.250.000	10,8	12.500	5.750	6.000	750	0	0	685.000
GT1										
940	37	7.510.000	10,7	7.500	2.250	4.650	600	0	0	291.000
959	36	7.440.000	10,5	6.500	2.275	3.770	455	0	0	409.000
966	34	8.070.000	10,2	9.600	4.224	4.608	768	0	0	541.000
GT2										
960	34	8.000.000	10,1	9.400	3.290	5.452	658	0	0	497.000
965	32	6.720.000	9,5	6.600	2.970	3.036	594	0	0	713.000
18	34	7.520.000	10	7.800	3.198	4.056	546	0	0	304.000
GT3										
988	32	7.420.000	9,5	15.300	5.967	8.109	1.224	0	0	603.000
17	31	7.080.000	9,7	8.600	3.956	4.042	602	0	0	863.000
983	33	7.450.000	9,7	7.900	4.108	3.239	553	0	0	670.000

Día 45	25-nov									
Caravana	Hto	GR	Hb	GB	N	L	M	E	B	Plaquetas
GC										
16	33	8.100.000	10	8.100	3.240	3.645	1.215	0	0	666.000
970	34	7.500.000	10,4	12.300	3.690	7.626	984	0	0	380.000
985	39	7.770.000	9,6	10.600	4.240	5.300	1.060	0	0	733.000
GT1										
940	38	7.520.000	11,2	10.500	4.620	4.725	1.155	0	0	388.000
959	36	7.370.000	10,8	8.200	3.362	4.100	736	0	0	472.000
966	32	7.540.000	9,8	9.100	4.368	4.004	728	0	0	408.000
GT2										
960	32	7.360.000	10	10.600	5.292	4.320	1.188	0	0	578.000
965	31	6.480.000	9,3	6.700	3.886	2.077	737	0	0	657.000
18	32	7.110.000	9,4	7.000	3.220	3.080	700	0	0	282.000
GT3										
988	32	7.980.000	9,8	10.200	5.100	4.284	816	0	0	712.000
17	31	7.940.000	9,7	10.400	5.096	4.472	832	0	0	681.000
983	33	7.690.000	10,1	6.600	3.102	2.772	726	0	0	569.000

Día 60	09-dic										
Caravana	Hto	GR	Hb	GB	N	L	M	E	B	Plaquetas	
GC											
15	31	7.870.000	9,4	8.200	4.100	3.444	656	0	0	563.000	
970	34	7.680.000	10	11.500	3.795	6.900	805	0	0	292.000	
985	35	7.230.000	10,6	12.600	5.418	6.174	1.008	0	0	407.000	
GT1											
940	37	7.650.000	11,2	12.100	6.292	5.082	726	0	0	472.000	
959	38	8.000.000	11,2	7.500	2.850	4.050	600	0	0	729.000	
966	34	8.080.000	10	10.800	5.508	4.644	648	0	0	535.000	
GT2											
960	30	7.130.000	9,2	16.600	9.462	6.142	996	0	0	573.000	
965	32	7.000.000	9,7	13.900	9.174	3.753	973	0	0	669.000	
18	34	7.550.000	9,6	8.700	4.350	3.654	696	0	0	389.000	
GT3											
988	34	7.970.000	9,8	16.200	8.100	7.128	972	0	0	470.000	
17	33	8.470.000	9,7	12.800	7.168	4.992	640	0	0	613.000	
983	33	7.840.000	9,7	8.500	4.505	3.485	510	0	0	541.000	

ANEXO II

Se puede observar que en el informe realizado por el INTA –Rafaela para el día 30 post vacunación todos* los animales fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra *Babesia spp*.

*: El trabajo de investigación contó con 13 terneros al principio, pero para ser más homogéneos los grupos, se trabajó solo con 12 individuos divididos en cuatro grupos de n=3. Por eso en el día 30 pos vacunación se mandaron 13 muestras.



2019 - AÑO DE LA EXPORTACIÓN

INFORME PRELIMINAR DE RESULTADOS

N° de Protocolo: H19-0335.
 Fecha: 22/11/2019.
 Profesional: del Río Alvarez, Florencia (MV).
 Localidad: Yofre (Corrientes).
 Material recibido: 13 muestras de suero de terneros.
 Análisis realizados: ELISAs Anoplasmo spp y ELISAs Babesia spp.
 Establecimiento: ¿?
 Proprietario: ¿? Antecedentes: ¿?
Resultados:
 Las 13 muestras de suero son negativas a la presencia de anticuerpos contra *Babesia spp* y *Anoplasmo spp*.
Comentarios
 La información epidemiológica que debe acompañar a las muestras para diagnóstico, permiten la interpretación de los resultados, y el mantenimiento de registros útiles para estudios poblacionales.

Echalarde Igarzo, MV: MSVS
 Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria
 INTA EFA Rafaela, CC 22, 2300-Rafaela, Santa Fe, Argentina.
 Correo-e: ecchalarde@intarafa.gov.ar
 Teléfonos: 54 3492 440121/40125 Ext. 437; 418; 499.

Moralet Nicolás, MV: MSc

El día 60 post vacunación los resultados del INTA-Rafaela evidenciaron que del total de las muestras enviadas, el lote 2=GT3 presento 33% de anticuerpos contra *Babesia spp.* Indicando que un animal del grupo vacunado con *B. bigemina* + el adyuvante Coa-ASC16 logro producir anticuerpos específicos.



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca de la Nación

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Estación Experimental Agropecuaria
Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria
CC 22. 2300-Rafaela (Santa Fe)

2019 - AÑO DE LA EXPORTACION

INFORME PRELIMINAR DE RESULTADOS

N° de Protocolo: H19-0385.

Fecha: 23/12/2019.

Profesional: Roldi Meza, Matias (MV).

Establecimiento: Los Algarrobos.

Localidad: Los Algarrobos (Pcia.: Corrientes).

Propietario: Méndez, Carlos Mauricio.

Materiales recibidos: muestras de suero de 7 terneros.

Análisis realizados: ELISA *Babesia spp.*

Antecedentes: Animales vacunados contra hemoparásitos hace 60 días.

Resultados:

Proporción de muestras de suero con anticuerpos contra *Babesia spp.*

Lote 1 (1-4): *B. bovis*: 0%, *B. bigemina*: 0%

Lote 2 (5-7): *B. bovis*: 0%, *B. bigemina*: 33%.

Comentarios

La información epidemiológica que debe acompañar a las muestras para diagnóstico, facilitan la interpretación de los resultados, y el mantenimiento de registros.

Las muestras que no se reciben identificadas individualmente no serán procesadas.

Echaide Ignacio, MV: MSVS

Moriel Nicolás, MV: MSc

Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria
INTA, Est. Rafaela, CC 22. 2300-Rafaela, Santa Fe, Argentina.
Correo-e: estacionrafaela.inmunologia@inta.gov.ar
Teléfonos: 54 3492 440121/40125 Ext. 437, 418, 499.