

Echegoyen, Maia

Evaluación de la respuesta del conjugado citokina/bacterina inactivado de Moraxella bovis β hemolítica en bovinos con queratoconjuntivitis

**Trabajo final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Echegoyen, M. (2011). *Evaluación de la respuesta del conjugado citokina/bacterina inactivado de Moraxella bovis β hemolítica en bovinos con queratoconjuntivitis* [en línea]. Trabajo final, Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/evaluacion-respuesta-conjugado-citokina-bacterina.pdf>.

(Se recomienda indicar fecha de consulta al final de la cita. Ej: [Fecha de consulta: 19 de agosto de 2010]).



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias
Ingeniería en Producción Agropecuaria

**“Evaluación de la respuesta del conjugado citokina/bacterina
inactivado de *Moraxella bovis* β hemolítica en bovinos con
queratoconjuntivitis.”**

Trabajo Final de Graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria

Autor: Echegoyen Maia

Profesor Tutor: Dr. Diego Jorge Sabatini

Fecha: 17 de Marzo de 2011

Agradezco al Doctor Diego Jorge Sabatini, Profesor Adjunto de la Cátedra de Sanidad animal de la Carrera Ingeniería en Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina. Tutor de mi Trabajo Final de Graduación, por su compromiso, su valiosa colaboración, su apoyo, por su empeño, su orientación, formación y constante enseñanza durante el desempeño de este trabajo.

Agradezco al Dr. Raúl A. Fasan, Director Técnico del Laboratorio de Sanidad Animal, de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina. Por su gran cooperación, por su aprendizaje, su buena disposición y su tiempo brindado.

Agradezco Dr. MSc. Pablo Maure, Profesor Docente Auxiliar de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires); Director del Centro de Inmunoterapia Veterinaria (CIV), por su ayuda, su buena voluntad, su enseñanza, y su disposición.

Agradezco a la Profesora Adjunta de Estadística y Biometría y de Métodos de la Investigación Licenciada Adriana Pérez, por su apreciable colaboración, y su grandiosa voluntad.

Agradezco al personal del campo “La Espadaña”, y al personal del Laboratorio de Sanidad Animal, facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina. Por su valiosa cooperación, y generosidad.

Sin la ayuda de ellos la realización de este Trabajo no hubiese sido posible.

Resumen:

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina es una enfermedad infectocontagiosa, de amplia distribución mundial, de gran importancia en nuestro país, es importante su impacto económico en los sistemas de producción.

El agente etiológico es la *Moraxella bovis* spp., bacteria GRAM (-) con atributos particulares en su patogenicidad. Los métodos preventivos de esta enfermedad no han demostrado ser eficientes en términos a la respuesta de la inmunización preventiva. Por esta razón el objetivo principal de este ensayo fue evaluar la respuesta inmunitaria conjuntival, desafiando a través de la infección experimental con cepas patógenas de *M. bovis*¹ a un conjugado de citocina combinado con bacterina y a una bacterina sin conjugar, frente a un lote testigo. El método permitió evaluar la respuesta inmunitaria a través de indicadores directos e indirectos a las respuestas obtenidas.

Para llevar adelante el ensayo se contó con una dotación de 140 vaquillonas de raza Aberdeen Angus con edad comprendida entre los once y doce meses de edad. Del conjunto de animales se conformaron tres grupos al azar. Un grupo fue inoculado localmente con bacterina (Grupo A), otro con un conjugado bacterina-citocina (Grupo B), y otro con un placebo constituido por una solución fisiología estéril bufferada de cloruro de sodio (Grupo T).

A lo largo del ensayo se evaluaron indicadores de medición local² e indicadores de medición indirectos³. Previamente al desafío con cepas de *M. bovis*, en laboratorio se cultivó y desarrolló el patógeno obtenido a través de hisopados conjuntivales de focos de enfermedad presentes en distintos establecimientos de la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos. La programación del ensayo se ajustó a un cronograma definido en los siguientes intervalos de 15; 21; 24; 27; 30 y 33 días.

Se realizó un análisis de la varianza según el diseño de medidas repetidas para los tres grupos, buscando diferencias en los indicadores de medición indirectos, recuento de glóbulos blancos, porcentaje de hematocritos y peso. Sin obtener diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tres grupos para ninguna de las variables analizadas.

El trabajo permitió arribar a que el tratamiento con el conjugado (bacterina-citocina) promueve la actividad protectora del sistema inmune inespecífico y modula su respuesta local.

¹ Tres cepas de campo de *Moraxella bovis* β hemolítica de patogenicidad comprobada.

² Tipo, magnitud y severidad de lesiones oculares y su evolución

³ Hematológicos, inmunológicos, microbiológicos y químicos.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN:	5
A.	QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA (QIB)	5
1.	<i>Moraxella bovis</i>	7
2.	Tratamiento	7
B.	SISTEMA INMUNOLÓGICO	8
1.	La Respuesta inmune	10
a)	Respuesta primaria y secundaria	10
2.	Citoquinas	12
a)	Interferón	12
b)	Interleuquinas	13
C.	BACTERINA	14
D.	OBJETIVOS PLANTEADOS	15
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
A.	DISEÑO EXPERIMENTAL	15
1.	Obtención de la bacterina de <i>M. bovis spp</i>	16
2.	Obtención de la citocina	17
3.	Obtención de la suspensión bacteriana de <i>M bovis</i>	17
4.	Inoculación	17
5.	Muestreo	18
a)	Toma de sangre	18
b)	Determinación del peso vivo de las terneras	21
c)	Hisopado	21
d)	Recuperación del patógeno	22
e)	Toma de pH de la conjuntiva ocular	23
f)	Impronta	24
g)	Clasificación de las lesiones oculares	24
III.	RESULTADOS	27
a)	Toma de sangre	32
b)	Determinación del peso vivo de las terneras	37
c)	Hisopados	38
d)	Recuperación del patógeno	38
e)	pH en el film lacrimal	39
f)	Improntas	39
g)	Clasificación de las lesiones oculares	40
IV.	DISCUSIÓN	42
V.	CONCLUSIONES	42
VI.	BIBLIOGRAFÍA	44

I. INTRODUCCIÓN

El estatus sanitario de los rodeos de cría y recria es uno de los pilares más importantes en los resultados productivos, ya que se ve reflejado en la empresa agropecuaria, impactando económicamente en los resultados. Los sistemas de producción han intensificado sus planteos productivos imponiendo mayores exigencias sin desmedro que los animales puedan expresar su mérito genético expresado en el potencial productivo. Estos nuevos modelos con distintas exigencias técnicas (ej.: sistemas de encierre a corral y/o feedlot) trajeron aparejados una mayor atención en el manejo del riesgo sanitarios en atención especial a las enfermedades de carácter infectocontagiosas.

Para una mejor comprensión se definieron conceptos básicos que permitieron tomar mejores decisiones.

A. QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

Se trata de una enfermedad infecciosa de alta contagiosidad y de alta difusión, que afecta las estructuras oculares de los bovinos.

Como su nombre lo indica, se caracteriza por un síndrome caracterizado por inflamación de la córnea y tejido conjuntival de magnitud y severidad variables acompañados de signos como lagrimeo intenso o epifora, opacidad de la córnea llegando a producir úlceras sobre esta estructura, como también, síntomas de incomodidad, intolerancia a la luz, dificultad en la visión hasta la ceguera y posible muerte por panofthalmitis y septicemia.

Es una enfermedad de amplia distribución mundial, apareciendo en los rodeos de cría, invernada y tambo (Zielinski et al. 1997), los sistemas intensivos con altas cargas son los de mayor riesgo al contagio, debido al contacto directo entre los animales, ya que la transmisión de esta enfermedad se produce entre otros factores por infección de las descargas oculonasales, como también por vectores artrópodos y otros vehículos entre ellos la manipulación del hombre durante el manejo de la hacienda en la manga (Quinteros Cornejo). Por tanto los sistemas como recrias e invernadas intensivas, encierres a corral y feedlot son más propensos a la aparición de la enfermedad. No obstante se han presentado brotes en rodeos de cría extensivos.

La *M. bovis* es el agente etiológico fundamental, esta bacteria puede estar presente “contaminando los ojos” pero sin necesariamente producir signos de enfermedad. Se lo ha podido aislar de la mucosa conjuntival, mucosa de ollares y mucosa vaginal de los bovinos sin signos de enfermedad. Esta condición de portadores asintomáticos, puede perpetuar y constituirse como foco de infección manteniendo la enfermedad en forma endémica.

La QIB (Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina) se presenta mayormente en animales jóvenes pudiendo aparecer cuadros de enfermedad en otras categorías.

Habitualmente el síndrome se presenta en primavera verano, a comienzos del otoño esporádicamente existen brotes en invierno. No obstante los factores más importantes en la presentación de la enfermedad, son el aumento de la intensidad de los rayos UV y la mayor actividad de las poblaciones de moscas, que son los vectores que diseminan la enfermedad (*Musca autumnalis* y *M. bezzii*), otros factores que agravan la enfermedad son resecaamiento de la superficie corneal, irritación causada por el polvo, pastos lignificados o encañados, carencia de nutrientes (vitamina A), animales con defensas bajas o débiles, y factores estresantes como altas cargas de animales (feedlot) problemas de manejo, destete, etc.

La falta de pigmentación en los párpados es otro factor predisponente; se ha encontrado una correlación entre el grado de pigmentación y la incidencia e intensidad de las lesiones. Por esto las razas británicas como, Hereford, Holando y Shorton son las más propensas a la QIB, la raza Aberdeen Angus en mucha menor medida y las Indicas generalmente no son afectadas.

Existen también otros agentes causales que pueden aparecer en forma combinada con *M. bovis* y de esa manera provocar lesiones más graves. Entre estos agentes encontramos el Herpesvirus Bovino (virus IBR/IPV), *Neisseria catarrhalis*, *Mycoplasma spp.* y *Chlamidya spp.* colaborando sinérgicamente con la patogenicidad característica de la QIB.

La mayoría de los autores consideran a los agentes nombrados anteriormente como oportunista secundarios, siendo el único agente etiológico que produce esta enfermedad la bacteria *M. bovis*. Se sostiene que sin esta bacteria no se producirían la queratitis y conjuntivitis características de la afección, de hecho el virus IBR produce conjuntivitis, pero no queratitis.

Los síntomas iniciales son contracción de pupilas, fotofobia (los animales cierran sus ojos por intolerancia y molestia de la luz) y procesos inflamatorios en las estructuras del ojo.

Se pueden producir desde leves opacidades en las córneas, como nubéculas, a procesos más graves como úlceras con perforación de los medios refringentes e infección de todo el globo ocular (panoflalmía). Otra lesión característica es la formación de queratocono consistente en la deformación de la convexidad corneal con respuesta a un proceso inflamatorio grave. El animal puede recuperarse espontáneamente, pero también se puede llegar a la ceguera bilateral por infiltración fibroblástica y cicatrización del tejido corneal afectado.

Esta enfermedad es de suma importancia ya que produce un impacto negativo como pérdidas de peso en los animales, mayores costos por tratamientos locales y atención por parte del personal y/o veterinario cuando aparecen los brotes de enfermedad.

El conjunto de factores predisponentes y desencadenantes influyen directa o indirectamente en la rentabilidad de cualquier sistema de gestión productiva si la enfermedad no es controlada o no se toman las medidas preventivas adecuadas:-

1. *Moraxella bovis*

Moraxella bovis es una bacteria Gram (-) en forma de coco o bastón, aerobios, correspondientes a la familia *Neisseriaceae*. Esta bacteria presenta dos factores de virulencia, que son desencadenantes de esta enfermedad: una hemolisina y fimbrias o pilis. La hemolisina es citotóxica, destruye la cornea produciendo un proceso inflamatorio que deforma al ojo y le produce lesiones de moderadas a graves. Las fimbrias son unas prolongaciones citoplasmáticas que se adhieren en forma específica en determinado tipo de células que conforman las estructuras corneales. Éstas se identifican como pilli "I" y "Q", siendo aquellas cepas con pilli "Q" en su estructura bacteriana más infecciosas que los agentes con Pilli "I". Existen distintos tipos de fimbrias, de muy variada composición proteica, cada pilis genera anticuerpos que protegen únicamente contra ese tipo piliar, pueden llegar a proteger a otros tipos de fimbrias pero en mucha menor medida (Zielinski 2005).

2. Tratamiento

Los tratamientos para buscar la curación tienen altos costos directos, ya que son realizados en forma individual buscando mayor efectividad. No obstante el buen resultado terapéutico, el control de esta enfermedad es muy difícil de lograr y la eficiencia de los tratamientos preventivos existentes termina siendo incierta. Anteriormente describimos diferentes características de la enfermedad y del agente etiológico, muchas de estas características son el fundamento de la difícil prevención de la enfermedad. Por un lado la diversidad antigénica de los pilis de las diferentes cepas, que a su vez tienen varios serogrupos de *M. bovis*, hace difícil el control de la queratoconjuntivitis. En un mismo rodeo se han observado diferentes tipos piliares infectando los ojos, por esta razón, los anticuerpos protectores tendrían que estar dirigidos contra todos los tipos piliares que poseen las *M. bovis* que infectan al rodeo (Zielinski 2005). La protección con una bacterina monovalente⁴ tiene por lo general una respuesta antigénica muy buena, pero sólo si el serogrupo homólogo del pilli está contenido en la vacuna. Contrariamente la respuesta antigénica no es beneficiada cuando en lugar del uso de bacterinas monovalentes se utilizan bacterinas con diversos serogrupos⁵. Otra característica fundamental que hace a la *M. bovis* más patógena, es la capacidad de cambiar su mecanismo de virulencia, el pilli "I" puede cambiar a pilli "Q" convirtiéndose en un serogrupo altamente patógeno.

⁴ Vacuna monovalente: vacuna que contiene un solo serotipo o serogrupo de un mismo microorganismo

⁵ Vacuna polivalente: contiene varios serotipos o serogrupos de un mismo microorganismo

Una razón más que explican el dificultoso control, son las toxinas producidas por esta bacteria, las que se inactivan fácilmente, por lo que las vacunas deberían contener altos títulos de antígenos capaces de generar una respuesta inmune eficaz contra esas toxinas, cuestión hasta el momento dificultoso de lograr.

Hay que tener en cuenta que en infecciones localizadas causadas por organismos no invasivos, como en el caso de la *M. bovis*, el desarrollo de anticuerpos secretores parece ser un importante mecanismo de defensa específicos (Nayar; Saunders 1973). La clase principal de anticuerpo encontrado en las secreciones lacrimales que bañan la superficie corneal es la Inmunoglobulina A (IgA). Esta es generada mayormente por la estimulación antigénica de los tejidos linfoides cercanos a la superficie a defender, en este caso la conjuntiva ocular y la cornea. Su misión es neutralizar las toxinas y evitar que la bacteria se adhiera a la cornea. Las lagrimas tiene poca o nula cantidad de inmunoglobulinas G (IgG), que se producen por la aplicación de vacunas por las vías habituales como son subcutáneas o intramuscular (Zielinski 2005). Las vacunas piliadas estimulan tanto la producción de Ig A en las lágrimas y de Ig G en el torrente sanguíneo (Schering Plough Veterinaria S.A).

En estudios realizados con distintas vacunas en un rodeo con un brote importante de QIB, no se han detectado diferencias en el índice de lesión entre grupos vacunados y grupos sin vacunar (testigos) (Zielinski 2000). En Estados Unidos las respuestas a las vacunaciones son muy inciertas como en nuestro país; en Australia no se vacuna contra esta enfermedad, la recuperación ocurre sin tratamiento (Zielinski 2000).

Una forma de prevenir esta enfermedad infectocontagiosa es a través del control de las moscas, que como se señaló, son el principal vector de *M. bovis*, esto resulta difícil y no muy eficiente y sólo aporta un resultado relativo estacional, y no para la aparición de brotes invernales. También podrían intentarse la prevención mediante la administración de vacunas en forma previa a los momentos de mayor estrés del animal como por ejemplo, el momento del destete y transporte, o durante la etapa de crianza artificial y recría en caso de ganado lechero. En estas circunstancias los animales disminuyen sus defensas quedando con mayor riesgo por exposición a una infección.

B. SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico se define en un conjunto de estructuras y procesos biológicos, en funcionamiento constante protegiendo al animal con capacidad de detección de la identidad antigénica agentes extraños, reconociendo lo propio de lo ajeno a través de sus receptores.

La detección no es siempre efectiva, los patógenos pueden producir adaptaciones logrando evitar el sistema inmunitario, o pueden llegar a evolucionar rápidamente, consiguiendo infectar al organismo.

En el sistema inmune ocurren tres etapas:

- 1) Presentación del antígeno.
- 2) Expansión clonal o cooperación.
- 3) Efectores.

Estas etapas ocurren en los ganglios de todo el cuerpo. El tejido linfático asociado a mucosas (TLAM) comprende el tejido ocular, el orofaríngeo, el intestinal, el genital, el urinario, y algunos autores incluyen a la piel dentro de este tejido ya que puede actuar de manera similar a las mucosas. Este tejido con autonomía fisiológica y anatómica se divide en organizado y difuso, en este último, solo ocurre la etapa en los que actúan los efectores a diferencia del TLAM organizado donde el sistema inmune es similar al de los ganglios, ocurriendo las tres etapas mencionadas, presentación del antígeno, expansión clonal y la actuación de los efectores. Una característica que tiene la inmunidad de las mucosas es el proceso llamado *transitosis u homming*, es aquel mecanismo donde al ser estimulado uno de estos tejidos, por la aparición de agentes extraños, se desencadenan los procesos del sistema inmune transfiriendo el estímulo a los otros tejidos pertenecientes al TLAM, logrando una protección a nivel de otro tejido donde no se produjo el ingreso directo del patógeno. (El estímulo que aparece en la boca por ejemplo protege a nivel genital)

1) Presentación del antígeno:

La presentación del antígeno a los linfocitos genera una cascada de eventos que va a resultar en las reacciones inmunes humorales y celulares. (Vandeputte 2004)

Al ingresar el patógeno al organismo es reconocido primeramente por los llamados macrófagos o células presentadoras de antígenos (CPA), éstas procesan y presentan al antígeno a los linfocitos T, generando la respuesta inmune. El antígeno procesado, se une a los linfocitos T CD4, llamados linfocitos T helper, gracias a receptores de linfocitos T (TCR), éstos poseen péptidos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad en la membrana plasmática de macrófagos y otras CPA. Cuando se logra la unión se secretan Citocinas, las Interleuquinas 2 (IL2) vuelven a actuar sobre los LT CD4 y estimulan la acción de los linfocitos B, estos gracias a sus Ig de membrana reconocen al antígeno directamente tal como entra al organismo sin necesitar que este sea procesado por las CPA.

2) Expansión clonal o cooperación:

Al recibir la información los linfocitos T de la presencia del antígeno se activan, éste prolifera y se diferencia en múltiples células derivadas, todas tienen idéntico receptor de membranas, estas células se las denomina “*clon celular*”. Se

generan así dos subpoblaciones, por un lado representados por los Linfocitos T de memoria que son los que se encargan de mantener la memoria inmunológica sobre un antígeno en el organismo, por otro lado una subpoblación de Linfocitos T efectoras. Estos se dividen a su vez en Linfocitos T Helper 0, 1 y 2. Una de las acciones del Linfocito TH2 es el estímulo de la liberación de IL4, IL6 e IL10⁶, estos colaboran con la acción de los linfocitos B (LB). Cuando los linfocitos B reciben la información estimulados por IL2 del antígeno presente en el organismo, se activan, una población queda como linfocitos B de memoria y otra se diferencia en células plasmáticas, es la que secreta la inmunoglobulina y constituye la inmunidad humoral. (Tapia 1997)

Tanto las células B y T de memoria son aquellas que han sido expuestas a un antígeno y que se convierten rápidamente, en células efectoras al encontrarse nuevamente con el mismo antígeno.

3) Efectores:

En esta etapa se generan las respuestas *inmune celular* y también la respuesta *inmune humoral*. A partir de los TH 1, se produce la secreción de citoquinas como la IL-2 (Interleuquina 2), el IFN- γ (Interferon γ), el factor de necrosis tumoral b (TNF-b) y otras interleuquinas, como la IL-12 (Interleuquina 12). Los Th1 (Linfocitos T helper 1) dirigen la respuesta celular la cual esta mediada por los Linfocitos CD8 (llamado citotóxico), las células NK (células Natural Killer), macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Estas células tienden a romper tejidos del organismo, así de esta manera le quitan el sustrato al patógeno. Generan una respuesta de tipo inflamatoria. Por otra parte los TH2 (Linfocitos T helper 2) dirigen la respuesta humoral, relacionada con la secreción de interleuquinas (IL), IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10 e IL-13. Esta respuesta humoral está mediada por Inmunoglobulinas.

Los elementos celulares y humorales que forman el sistema inmune, son los responsables de la defensa del organismo en su totalidad, siendo capaces de diferenciar lo propio de lo ajeno.

1. La Respuesta inmune

a) Respuesta primaria y secundaria

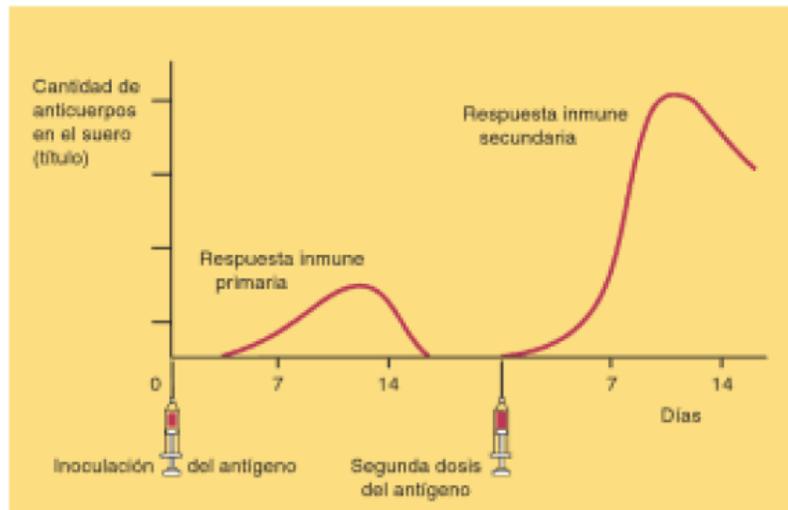
Al ingresar por primera vez un antígeno al organismo y ponerse en contacto con él, se produce una respuesta inmune que se denomina respuesta inmune primaria. Por el contrario, cuando el mismo patógeno después de un tiempo vuelve a activar el

⁶ Interleuquinas 4, 6 y 10, reconocidas como las citoquinas anti-inflamatorias, entre otras (González Álvarez et al. 2009)

sistema inmune se genera una respuesta que se denomina respuesta inmune secundaria o adaptativa.

La respuesta primaria antigénica desde la entrada del patógeno al organismo dura aproximadamente siete (7) días, se podría decir que esta respuesta prepara al organismo a un próximo ataque. Si existiera un desafío, un estímulo a los 21-28 días, se desencadenaría la respuesta secundaria, esta tardara entre 12 y 36 hs, es una respuesta más eficiente y rápida que la primera ya que el organismo está preparado, y no solo van actuar los efectores si no también la parte del sistema de la memoria.

Figura 1: Respuesta inmune primaria y secundaria.



Fuente: Inmunología veterinaria (Tizard 2009)

Esta curva muestra el nivel de anticuerpos circulantes en el plasma frente a la primera y segunda exposición a un antígeno determinado. Se logra observar la demora en la aparición, la baja potencia y la vida breve de la respuesta primaria, comparándose con la respuesta secundaria después de la exposición al mismo antígeno, la cual empieza rápidamente, es mucho más potente y forma anticuerpos durante meses.

Esta diferencia que existe en las respuesta primaria y secundaria se debe a que cuando un antígeno activa por primera vez a los linfocitos B, éstos tardan más en diferenciarse en células plasmáticas (responsables de la síntesis de Igs), a diferencia de lo que ocurre en la respuesta secundaria, que gracias a las células memoria el número de linfocitos sensibles es mayor y se alcanza más rápido el nivel de células plasmáticas.

2. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular sintetizadas y secretadas por diferentes tipos celulares del sistema inmune y células no inmunes (Aguirre de Avalos et al. 2002). Su denominación tiene que ver con las células que las producen, se llaman monocinas, las que son secretadas por macrófagos, linfocinas, por linfocitos o se denominan interleucinas las citoquinas secretadas por las células hematopoyéticas, también pueden ser producidas por otro tipo de células como las células endoteliales, epiteliales, del tejido conjuntivo y por leucocitos polimorfonucleares.

Las citoquinas son secretadas durante respuestas inmunológicas o como señal intercelular tras la estimulación de una de ellas (Sánchez Vizcaíno). Capaces de mediar e interactuar entre diferentes células, son responsables de la comunicación intercelular, regulan la función tanto de las células que las producen como también de células más alejadas. Su manera de actuar es uniéndose a receptores específicos, tanto de las células que las producen teniendo un efecto autocrino, como también uniéndose a receptores de células vecinas en donde su efecto es paracrino, o pueden diseminarse por el organismo afectando a células más alejadas y este efecto se denomina endocrino (Tizard 2009). Estas proteínas también actúan en la diferenciación celular y en funciones de proliferación, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas, interviene en la hematopoyesis. Su acción fundamental es la participación en la regulación del mecanismo de inflamación, existiendo citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Asimismo, participan en muchos otros procesos biológicos.

Las citoquinas tienen diferentes cualidades, como producir múltiples efectos al actuar sobre diferentes células, también tiene la particularidad de poder ejercer el mismo efecto diferentes citoquinas, otra cualidad de las citoquinas es el sinergismo donde dos o más citoquinas producen un efecto sinérgico donde se potencian mutuamente. Por otro lado pueden bloquear o inhibir mutuamente sus efectos, produciendo antagonismo.

Desde que están disponibles las citoquinas producidas por ingeniería genética, muchos investigadores han estudiado su uso para tratar enfermedades. (Tizard 2009)

Entre las citoquinas se incluye las interleucinas (IL), los interferones (INF), (desarrolladas a continuación) y factor de necrosis tumoral (TNF).

a) Interferón

Los interferones fueron descritos por Isaacs y Lindenmann en 1957 (Ferreira; Schafeld 1988). Son proteínas, pertenecientes a las citoquinas producidas en respuestas a la infección vírica o a la estimulación inmunológica (Tizard 2009).

Generalmente la producción de los interferones es inducida por otras citoquinas. Su metabolismo y excreción se produce principalmente en hígado y riñones. Parte de su mecanismo de acción está definido por la capacidad de bloquear la réplica de ARN vírico e interferir en la producción de las proteínas del virus.

Existen dos tipos de interferones: de tipo 1 y de tipo 2. Al primer tipo pertenecen los interferones *alfa* y *beta* son los más importantes de este grupo, los interferones *tau* y *omega* son subtipos dentro del tipo 1 (Bosch 1999).

Los interferones de tipo 1 son principalmente antivirales y presentan actividad antiproliferativa, su papel secundario es el de inmuno-reguladores; muchos interferones pertenecientes a este grupo tiene un papel importante en el mantenimiento de la gestación (Tizard 2009).

Los interferones gama pertenecen al tipo 2, tienen una función principalmente inmuno-reguladora.

En cuanto a la producción de los interferones podemos mencionar que los principales productores de interferón alfa son los linfocitos B, los linfocitos natural killer y los macrófagos. Si hablamos de interferón beta los principales productores son los fibroblastos, las células epiteliales y los macrófagos. Y por ultima los únicos productores conocidos de interferones gama son los linfocitos T, los macrófagos y las células natural killer. (Aguirre de Avalos et al. 2002).

La administración de interferones debería inhibir la replicación de los virus así como estimular algunas funciones celulares, como la actividad de los neutrófilos, promoviendo de ese modo la resistencia a la enfermedad, este último punto ha sido en parte el objeto el presente ensayo.

Se han utilizado interferones en el tratamiento de distintas enfermedades bovinas, como también se ha administrado en cerdos, los resultados obtenidos han sido positivos. El inconveniente que tiene el uso del interferón es la necesidad de administrarlos en dosis altas, en tratamientos de enfermedades infecciosas a pesar de dar respuestas positivas produce efectos secundarios tóxicos (dosis tóxicas). (Tizard 2009).

Lo que se ha buscado en el presente ensayo a través de la aplicación del interferón alfa y beta es una vía alternativa de inmunidad. Los interferones alfa y beta tienen la misma función, pero difieren en la forma de estimulación. Así, se buscó un efecto mimético con el IFN gama bovino a modo de favorecer la mitosis en la expansión clonal de LT y LB. El uso de IFN tiende a reforzar el perfil TH1 el cual va a promover la respuesta celular en mucosas.

b) Interleuquinas

Las interleuquinas son un conjunto de citocinas, que estimulan la proliferación, y diferenciación de células inmunes. Estas citocinas se numeran secuencialmente según el orden de su descubrimiento y se nombran numéricamente, IL-1, IL-2, IL-3 sucesivamente. Hasta el 2007 se habían descrito treinta y cuatro (34)

interleuquinas diferentes (Tizard 2009). Las células que segregan interleuquinas son, los macrófagos IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL18), células B(IL-10,il-12), células Th1 (IL-2), células Th2 (IL-4,IL-5,IL-6,IL-9,IL-10,IL-13), mastocitos (IL-4), células dendríticas (IL-6,IL-12,IL-13,IL-18,IL-23,IL-27), neutrófilos (IL-1,IL-8,IL-10,IL-12) y las NK (IL-2), entre otras. La función principal es regular los eventos de las funciones de las células del sistema inmune, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, regulación de otras citocinas y factores, etc. (Taleisnik 2006).

La IL 2 provoca una cascada de efectos inmunomoduladores, incluyendo la activación de células T y la expansión, la estimulación de las células presentadoras de antígenos, la secreción de citocinas proinflamatorias, y el aumento de la función celular de las NK y las killer activadas por linfocinas. Las IL-2 son necesarias para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de auto antígenos y antígenos extrajenos. (Tizard 2009)-

La IL2 es una CPA, al vacunar a los animales con esta citocina, lo que se busca es amplificar la especificidad. Las inmunoglobulinas están presentes en mayor concentración en mucosas, las inmunoglobulinas A se encuentran en mayor concentración en la mucosa ocular. Asimismo, con IL2 se buscó favorecer la mitosis de los LB y estos indirectamente que pudieran favorecer la aparición de IgA.

C. BACTERINA

Los objetivos de la aplicación de una vacuna son, imitando la enfermedad natural, estimular las células específicas del sistema inmunológico y también estimular la memoria inmunológica de las células, de esta forma, cuando la enfermedad se presente, el sistema inmunológico da una respuesta rápida y eficaz (Pfizer Animal Health 2001). Las vacunas están compuestas por antígenos, éstos son sustancias extrañas al organismo, que pueden unirse a los receptores de superficie de los linfocitos, induciendo a una respuesta inmune (Tizard 2009). Al hablar de bacterina estamos hablando de un inmunógeno bacteriano, elaborado a partir de cepas de bacterias patógenas muertas o inactivadas por métodos físico / químicos.

Si bien restringidas para el control de otras enfermedades, existen vacunas vivas atenuadas, donde la bacteria conserva su poder patógeno permitiendo estimular una respuesta inmune de mayor intensidad al de la vacuna inactivada. La ventaja de la bacterina es que es más estable y segura a comparación con la bacteria viva atenuada. (Sánchez Vizcaíno).

En el caso particular de la *M. bovis*, es una bacteria de naturaleza proteica, lo que le confiere la capacidad para actuar como antígenos en vacunas al inactivarse, y así generar anticuerpos capaces de neutralizar su acción. Los pilli también pueden actuar como componentes antigénicos, ya que son de naturaleza proteica. Los anticuerpos generados por éstos lograrían impedir que la *M. bovis* se adhiera a la superficie, colonice y produzca toxinas, y de esta manera evitarían el desarrollo de la

enfermedad (Zielinski 2005). Pero como mencionamos anteriormente la bacteria tiene desarrollado un sistema para evadir los anticuerpos, por lo tanto no bastaría la prevención solo con un buen antígeno.

El uso de la bacterina elaborada a partir de cepas patógenas de *M. bovis* inactivada, tuvo por motivo el de estimular el sistema inmune de los animales a los que fueron administrado, con el propósito de generar una barrera inmunitaria a través de anticuerpos para el momento del desafío.

D. OBJETIVOS PLANTEADOS

A partir de lo expuesto anteriormente se plantean los objetivos que dieron origen a este ensayo:

- Evaluar la efectividad preventiva de una bacterina coadyuvada con una citocina, inoculada sobre la conjuntiva ocular de bovinos, desafiados experimentalmente con una cepa patógena de *M. bovis*, analizar la evolución de la respuesta inmunitaria local y sistémica y evaluar si el conjugado bacterina/citocina exhibió ventajas sobre un grupo instilado con bacterina frente a un grupo testigo tratado con un placebo.
- Analizar la presencia del patógeno y su correspondencia con parámetros clínicos encontrados, la severidad y la magnitud de las lesiones y los recuentos hematológicos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio experimental tuvo una etapa de trabajo a campo realizado en el establecimiento “La Espadaña” ubicada en la ciudad de Verónica, partido de Punta Indio, provincia de Buenos Aires a una distancia aproximada de 150 kilómetros de la ciudad de Buenos Aires. Otra etapa fue ejecutada en Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina.

A. Diseño experimental

El trabajo se realizó sobre un grupo de treinta y cuatro (34) terneras de recría, raza Aberdeen Angus, sanas clínicamente, las condiciones de explotación para las terneras, eran las mismas, el peso oscilaba entre 160 kg y 185 kg, y la edad estaba comprendida entre once y doce meses. Estos bovinos se seleccionaron al azar a partir de una población de ciento cuarenta (140) terneras de recría. Antes de iniciar el ensayo todos los animales fueron desparasitados con la combinación de sales

bencilmidazólicas y avermectinas, respetando el manejo del establecimiento, las terneras se encontraban en un lote de pastizal natural. Otro manejo sanitario que se realiza en el establecimiento a todos los reproductores a partir del destete, es la inmunización de éstos contra enfermedades virales reproductivas, como IBR y DVB, aplicando refuerzos antes de la temporada de servicios.

Se conformaron tres (3) grupos de terneras, homogéneos, realizándose la asignación de los tratamientos a cada unidad experimental de manera aleatoria. Quedando así un grupo testigo (Grupo T, 12 terneras), un grupo instilado en la conjuntiva ocular con el conjugado bacterina/citocina (Grupo B, 11 terneras) y otro grupo al cual se le aplicó bacterina (Grupo A, 11 terneras).

Se obtuvieron muestras oculares y de sangre de todos los treinta y cuatro (34) animales, antes del comienzo del ensayo.



1. Obtención de la bacterina de *M. bovis* spp

La preparación de bacterina de *Moraxella bovis* se llevó a cabo en el laboratorio de sanidad animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA). Se procedió a la elaboración de una bacterina mixta a partir de tres (3) cepas producto de aislamientos de campo identificadas como *Moraxella bovis* por el Laboratorio de Sanidad Animal de dicha Unidad Académica (Mx Chajarí, Q8 Tandil, EPP63). Estas cepas fueron conservadas a -80°C , luego de descongeladas se procedió a su cultivo en agar base sangre bovina al 5% y se incubaron a 37°C durante 48 hs. Luego de la incubación, las colonias desarrolladas se resuspendieron en 10 ml. caldo cerebro corazón (BHI). A partir de este procedimiento se realizó su cultivo progresivo en medio líquido BHI en volúmenes crecientes, a 37°C , con agitación y aireación intensa, hasta un volumen final de cultivo de 10 lts. Se tomaron muestras para verificar la identidad del cultivo al final del período de incubación de 48 hs., posteriormente se inactivaron con formaldehído a una concentración final de 0,5%, manteniéndolo a 37°C durante 48

hs, con agitación. Luego de esto se tomaron muestras para verificar la inactivación. Posteriormente se procedió a la concentración de los cultivos por centrifugación a 5000 rpm durante 30' y posteriormente se resuspendieron los sedimentos obtenidos en solución buffer fosfato pH 7.2 (PBS). Se ajustó la concentración de cada una de las suspensiones en 10^{10} bacterias/ml según referencia nefelométrica (curva de Mc Farland), mediante agregado de PBS. Se utilizó como conservante de las suspensiones obtenidas formaldehído concentración final 0,2%. El producto final constituye la bacterina que se aplicó en uno de los grupos.

2. Obtención de la citocina

Se utilizó una solución compuesta de IL2 recombinante humano e interferón α y β recombinante humano. La dosis de 1 ml de esta solución estaba compuesta por:

- 300.000 UI de INF α .
- 300.000 UI de INF β .
- 50 microgramos (μg) de IL2.

La obtención de la citocina se llevó a cabo en el Centro de Inmunoterapia Veterinaria[®] (CIV).

3. Obtención de la suspensión bacteriana de *M bovis*

La preparación de la bacterina (la suspensión bacteriana) utilizada se elaboró en el Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UCA. La metodología fue la siguiente: a partir de cada una de las cepas utilizadas para la preparación de la bacterina, se realizaron cultivos en medio sólido utilizando botellas de Roux conteniendo agar base sangre enriquecido con 5% de sangre bovina estéril, incubándolas a 37° C durante 48 hs. Se utilizó caldo cerebro corazón (BHI) como solución para el lavado del desarrollo bacteriano en superficie. Se recolectaron las suspensiones bacterianas en un recipiente estéril, ajustando su concentración final a 10^{10} bacterias/ml según referencia nefelométrica (curva de Mc Farland), mediante agregado de PBS. Finalmente se obtuvo la suspensión que constituye el desafío que se aplicó por aspersión en la conjuntiva ocular de todos los animales del ensayo.

4. Inoculación

Luego de la obtención de la bacterina, la citocina y la suspensión bacteriana se procedió a las inoculaciones correspondientes en los diferentes grupos del ensayo.

Se inoculó a un grupo de terneras con la bacterina de *M. bovis* (Grupo A), a otro grupo con el conjugado citocina/bacterina (Grupo B), a ambos grupos aplicándole doble dosis separadas por tres semanas. Al tercer grupo se lo trató con un placebo de solución fisiológica buffereada de cloro de sodio estéril.

La inoculación en los tres grupos fue realizada por atomización en los dos ojos. En el caso del conjugado, primero se atomizó con la bacterina e inmediatamente después se aplicó la citocina. A los cuarenta y cinco (45) días posteriores de este suceso se realizó el desafío con la suspensión bacteriana obtenida de la manera descrita anteriormente. Los treinta y cuatro (34) animales volvieron a los potreros donde se encontraron a lo largo de todo el ensayo hasta su finalización.

5. Muestreo

A lo largo del ensayo se tomaron muestras de las conjuntivas oculares de todos los animales del ensayo mediante hisopados de ambos ojos, también se tomaron muestras de sangre, se determinó el valor del *pH* de las estructuras locales, se realizaron improntas en ambos ojos de los animales implicados, y se determinó el peso vivo de cada animal, estas muestras fueron tomadas cada 15, 21, 24, 27, 30, y 33 días respectivamente. En dos fechas se observaron las lesiones oculares.

a) Toma de sangre

La sangre fue extraída directamente de la vena coccígea media, se recolectó en tubos que contenían anticoagulante E.D.T.A, Preparados comerciales con gotero: 2-4 gotas de E.D.T.A. al 10 % por cada 5 ml. de sangre.

A partir de las muestras de sangre se realizaron diferentes prácticas en el laboratorio (FCA /UCA).

Técnicas de laboratorio:

- Método del hematocrito

Esta técnica consiste en separar la sangre, por medio de centrifugado la sangre se separa en tres (3) porciones bien definidas, hacia el fondo la masa de glóbulos aglomerados, inmediatamente por encima de la columna de eritrocitos una capa de color blanco o grisáceo, constituida por leucocitos y trombocitos, denominada capa leucocitaria, y por encima de esta última, el plasma sanguíneo. El microhematocrito expresa en porcentaje (%) la relación entre el plasma sanguíneo y la masa celular. (Coffin L.D. 1977)

Se utilizan capilares simples, los cuales se llenan por capilaridad tres cuartas partes, con la sangre obtenida en el campo con anticoagulante, con el dedo índice se tapa el extremo limpio del capilar, luego se limpia el exceso de sangre de la parte

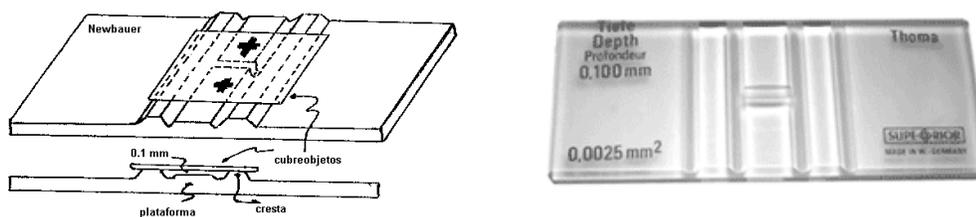
externa, en el mismo orificio de entrada de la sangre se sella con plastilina, el capilar se coloca en una microcentrifuga con el extremo de la plastilina hacia afuera, aquí se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos. Al terminar el centrifugado se procede a la lectura de cada capilar, este se coloca sobre la escala de referencia, deslizándolo hasta hacer coincidir la parte superior de la columna plasmática con el 10 % de la escala y al parte inferior de la columna globular con el 0, la línea que cruza la parte más alta de la columna globular representa el valor de hematocrito en porcentaje. (Schalm et ál. 1981).

- Recuento de glóbulos blancos

El método de recuentos de glóbulos blancos nos brinda información sobre el número de leucocitos presentes por milímetro cubico.

El procedimiento es el siguiente: con una pipeta se toma la sangre (sangre en anticoagulante obtenida en la toma de muestra a campo), se elimina el exceso con un material absorbente, se coloca en un tubo de ensayo ya preparado con transaminasa GOT, diluyente de glóbulos blancos, la dilución que se logra es 1:20, el tubo se agita para homogenizar la muestra. Con una pipeta se toma una gota de la sangre diluida y se la coloca en la cámara cuentaglóbulos, llenándose por capilaridad. La cámara cuentaglóbulos se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, el fondo de la cual se ha marcado una cuadrícula, que consiste en un cuadrado de 3 x 3 mm compuesto de 9 cuadrados, los cuadrados de las esquinas están divididos por 16 cuadrados y son los utilizados para el recuento de leucocitos. La cámara está compuesta por dos de estas cuadrículas separadas entre sí por un surco. Esto permite hacer dos recuentos simultáneos. La profundidad de estas cuadrículas están dadas por dos barras laterales sobre elevadas donde se apoya el cubreobjetos. El volumen de la cámara es de 1 mm² en cada cuadrícula. (Schalm et ál. 1981).

Figura 2: Cámara cuenta glóbulos



Fuente: Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Cs. Veterinarias. Cátedra de fisiología

Una vez llenada la cámara se lleva a microscopio, se ubica el objetivo 10 X y se procede a leer en los 4 cuadrantes de las esquinas. Para calcular la cifra total a la suma de los cuatro cuadrados de las esquinas se multiplica por 50, dando así el total de los leucocitos por mm³. Ya que cada cuadrado tiene un área de 1 mm² y su profundidad son de 0,1 mm. Por lo tanto contamos 4/10 mm³, y considerando que la

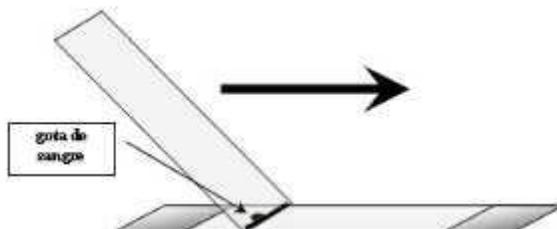
dilución es de 1:20 tenemos, $4/10 \times 1/20 = 1/50 \text{ mm}^3$ de sangre sin diluir. (Coffin L.D 1977).

- Fórmula leucocitaria

Esta fórmula tiene por objetivo determinar los porcentajes de las distintas clases de leucocitos, y a partir de estos puede calcularse el número real de cada clase de leucocitos por mm^3 de sangre (valor absoluto), conociéndose el total de leucocitos.

Se procedió a realizar un frotis con la sangre, extraída de los animales y en un portaobjeto se colocó una gota de esta, luego con la ayuda de otro portaobjeto se realizó el extendido de sangre.

Figura 3: frotis de sangre



Fuente: Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Cs. Veterinarias. Cátedra de fisiología

Luego de esto se pasa el portaobjeto con el extendido por un fijador, luego por el colorante 1 se enjuaga para después ser sumergirlo en el colorante 2, al terminar se vuelve a enjuagar con agua, se deja secar y anteriormente a las observaciones en microscopio se le coloca una gota de aceite para mejorar la visualización, el portaobjeto se lleva a objetivo 100 X. En el microscopio se procedió a contar 50 leucocitos en cada frotis, contando cada tipo de leucocito (linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos), luego dividiéndolos por el total de leucocitos contados (50) se obtuvo el porcentaje de cada uno de los tipos de leucocitos.

Figura 4: Monocito

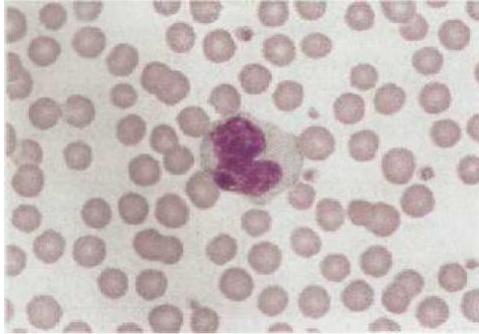


Figura 5: Linfocito

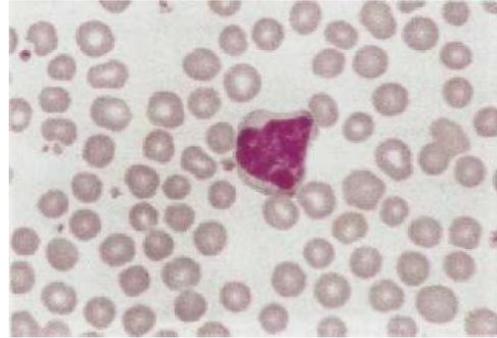
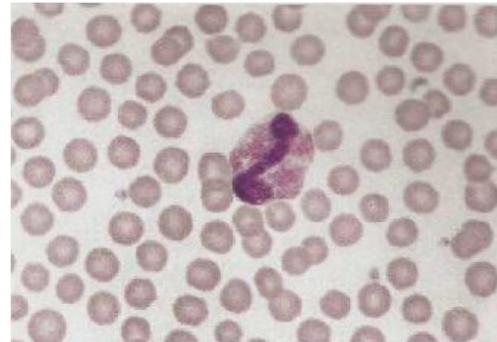


Figura 6: Neutrófilo



Figura 7: Eosinófilo



Fuente: Hematología Veterinaria. Atlas de Especies Domésticas Comunes

b) Determinación del peso vivo de las terneras

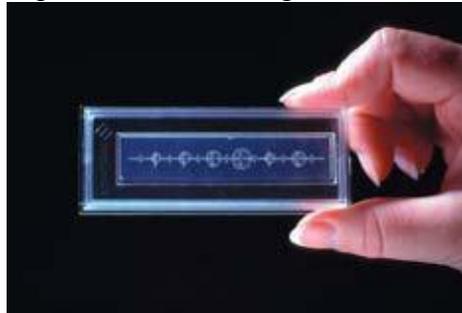
La variable ganancia de peso se tuvo en cuenta como un indicador indirecto, tomándose el peso de todos los animales antes del ensayo y durante, hasta después de finalizado. Los tres grupos seleccionados comenzaron en el ensayo con pesos similares entre ellos, de manera que el inicio se produce con grupos homogéneos. Esta variable se valorizó conociendo las características de la queratoconjuntivitis, sabiendo que la molestia de los animales por las lesiones y el malestar puede derivar en una mala alimentación, disminución del apetito, dificultad por parte del animal para la elección de pastoreo y de más factores que proviene indirectamente de la enfermedad.

c) Hisopado

Determinación de la actividad de la Inmunoglobulina A (IgA) en film lacrimal:

El fin de esta determinación fue identificar la concentración en el film lacrimal de inmunoglobulinas (Ig A), y de esta manera evaluar la respuesta inmunitaria local. El procedimiento fue el siguiente; los hisopados bilaterales de cada animal obtenidos a campo se suspendieron en tubos que contenían 1 ml de solución salina tamponada (PBS). A cada tubo se adicióno azida sódica como conservante en una concentración de 0.01 %. Las muestras hasta el momento de la utilización en el laboratorio se conservaron a -70 °. El método que se utilizo en el laboratorio es el método Single Radial Immunodiffusion VMRD Inc. que indica la concentración de Ig A, a través de un medio de cultivo especial contenido en una placa rectangular en concentraciones conocidas.

Figura 8: Placa perteneciente a Single Radial Immunodiffusion



Fuente: www.vmr.com

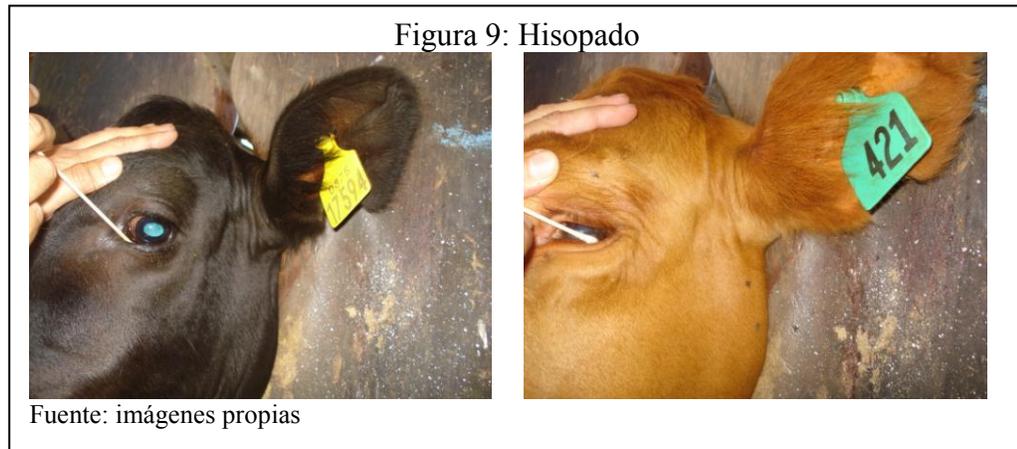
d) Recuperación del patógeno

Una vez finalizado el ensayo, se procedió a recuperar el patógeno, posteriormente se cultivó y se desarrolló en el laboratorio, satisfaciendo así los postulados de Koch.

Se tomaron muestras de conjuntiva ocular de los animales al azar tanto de inmunizados como testigos, mediante hisopado de ambos ojos de cada animal. Se realizó la recuperación del patógeno a partir de los focos de infección que aparecieron. Luego de obtener una muestra del film lacrimal, los hisopos fueron conservados en medio Stuart y enviados al laboratorio para su cultivo dentro de las 6 hs. de su extracción, se conservaron durante su traslado a 4°C. Se realizó el cultivo de los hisopados en agar base sangre bovina al 5%, incubándose a 37°C durante 48 hs. Luego se procedió a la observación y estudio de las colonias desarrolladas, y de esta manera identificar *M. bovis* entre las especies presentes. Para esto se tomo como criterio de identidad positivo a *M. bovis* el siguiente perfil microbiológico:

Perfil microbiológico:

Morfología bacteriana	Diplococos
Coloración de Gram	Negativa
β -hemólisis en agar sangre	Positiva
Desarrollo en agar Mc Conkey	Negativo
Oxidasa	Positivo
Desarrollo en TSI	Oxidativo
Catalasa	Positivo
Motilidad	Negativa
Ureasa	Negativo
Indol	Negativo
Gelatina	Positivo



e) Toma de pH de la conjuntiva ocular

Al total de animales y en forma individual se procedió a la determinación del valor del pH para cada uno de los momentos en que se realizaron los muestreos.

Figura 10: Determinación del pH lacrimal



Fuente: imágenes propias

f) Impronta

En las fechas mencionadas anteriormente de muestreo se realizaron las improntas, se procedió a colocar portaobjetos directamente sobre los ojos de las terneras, con el objetivo de evaluar la presencia celular y la identificación de linfocitos.

Figura 11: Impronta



Fuente: imágenes propias

g) Clasificación de las lesiones oculares

Se elaboró una tabla de puntajes (score) de acuerdo a presencia o no de lesiones en las estructuras oculares. El procedimiento fue, observar las lesiones en las estructuras oculares de las terneras, y para clasificarlas se estableció la tabla asignando un score (un valor numeral) de acuerdo al grado de las manifestaciones

clínicas⁷ de cada animal, en un ojo o en ambos para todas las terneras, teniendo en cuenta la presencia, magnitud y severidad de las lesiones encontradas. En los ojos de los animales se colocó fluoresceína, cuya función fue facilitar la detección de las lesiones corneales. Se fueron tomando todos los valores hallados a lo largo del ensayo, comenzando en el momento del desafío, de esta manera se logró establecer y orientar una tendencia de la respuesta inmunitaria local ante la actividad del patógeno. Se tuvieron en cuenta dos fechas puntuales, éstas fueron, luego del desafío, la tercera semana, y a los cuarenta y cinco días (45) días.

Referencia tabla de score y puntaje:

Ojo Normal (ON)	Congestión Conjuntival (CC)	Nube Corneal (NC)	Opacidad Corneal (OC)	Úlcera Corneal (UC)	Queratocono (QC)
-----------------	-----------------------------	-------------------	-----------------------	---------------------	------------------

Referencia: (ON)= 0; (CC)= 0.5; (NC)=1.0; (OC)=2.0; (UC)=3.0; (QC)=4.0

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) bajo el Diseño de medidas repetidas comparando las medias poblacionales de los tres tratamientos, en cada tiempo y para cada variable respuesta. Los factores fueron Tratamiento y Tiempo y las variables respuestas fueron, recuentos de glóbulos blancos, porcentaje de hematocritos y peso vivo. Se determinó si existían diferencias significativas entre las medias poblacionales, correspondientes a las variables, glóbulos blancos, hematocritos y peso vivo, de los tres grupos de tratamientos. El diseño de medidas repetidas se utiliza cuando una misma unidad experimental, en este caso las terneras son sometidas a diferentes mediciones, como ser peso, recuento de glóbulos blancos y hematocritos a lo largo del tiempo. Este diseño nos proporcionó información sobre tendencias en el tiempo de las diferentes mediciones que realizamos bajo los tres tratamientos.

⁷ Se siguió un esquema similar al propuesto por A. Fiorentino y col. “Lesiones oculares en terneros con queratoconjuntivitis infecciosa bovina infectados experimentalmente y en forma natural con *Moraxella bovis*”. Revista de Medicina Veterinaria (2001) Vol. 82 N° 3:166-170

El modelo estadístico según el Diseño de Medidas Repetidas para este estudio fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- y_{ijk} es la respuesta de cada individuo a cada tiempo (recuentos de glóbulos blancos, porcentaje de hematocritos y peso vivo)
- μ es la media de la respuesta de la población de vaquillonas
- α_i es el efecto fijo del tratamiento i ⁸
- $\beta_{j(i)}$ es el efecto aleatorio del individuo anidado en tratamiento
- γ_k es el efecto del tiempo k ⁹
- $\alpha\gamma_{ik}$ es el efecto de la interacción Tratamiento-tiempo
- ε_{ijk} es el error aleatorio

Las hipótesis derivadas del modelo estadístico son las siguientes:

- Ho: $\alpha\gamma_{ik} = 0$ es decir no hay interacción tratamiento-tiempo (Prueba de paralelismo)
- Ho: $\alpha_i = 0$ o bien $\mu_{.1} = \mu_{.2}$, es decir no hay efecto de los tratamientos
- Ho: $\gamma_k = 0$ o bien $\mu_{.1} = \mu_{.2} = \mu_{.3} = \mu_{.4}$ es decir no hay efecto del tiempo

Previo al análisis de la varianza, se verificaron los supuestos del modelo:

Las muestras fueron *aleatorias e independientes*, las terneras fueron elegidas al azar¹⁰ dentro de una población de ciento cuarenta (140) vaquillonas.

El supuesto de normalidad de los errores se verificó con los gráficos de QQ plot y los histogramas. (Ver resultados)

El supuesto de Homogeneidad de varianza se verificó con los diagramas de dispersión. (Ver resultados).

Para el análisis de la varianza se utilizó el software estadístico Infostat. Se trabajó con un nivel de significación del 5 %.

⁸ Los tratamientos son: inoculación con Bacterina (GA), inoculación con bacterina mas citocina (GB) y grupo testigo (GT).

⁹ Los tiempos son: 23/09/2009, 22/10/2009, 21/11/2009, 05/12/2009, 21/12/2009, 15/01/2010 y 06/03/2010

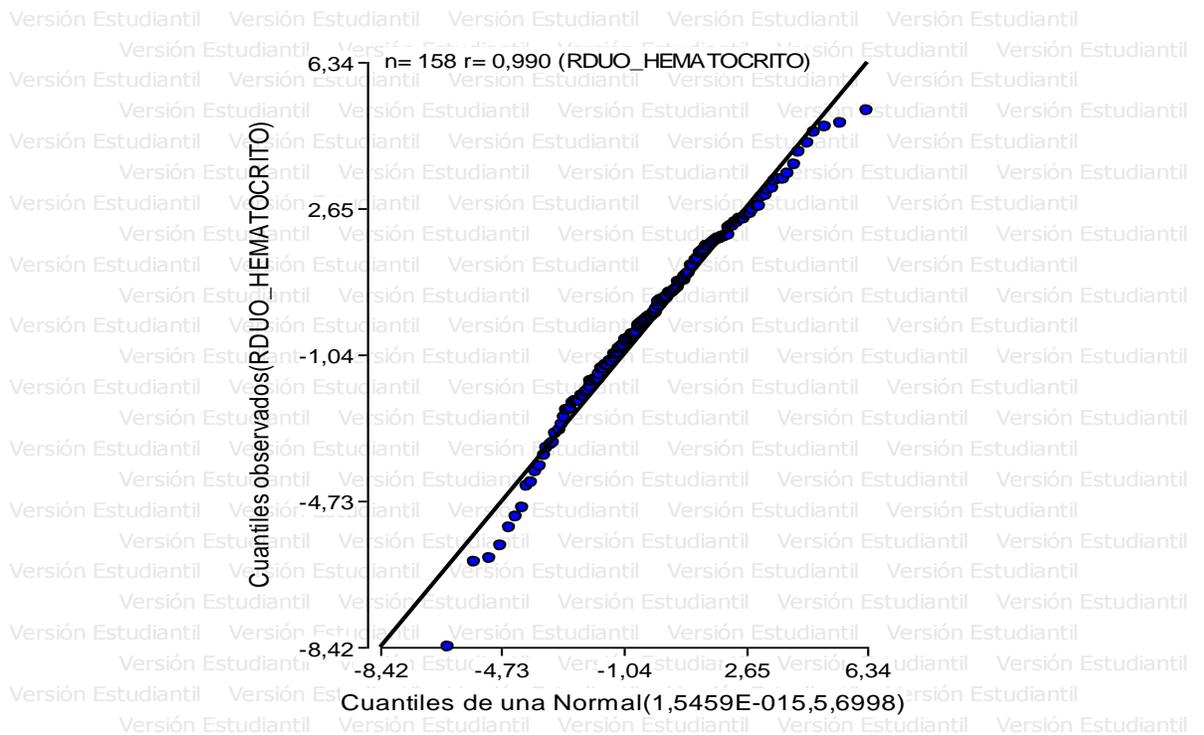
¹⁰ Muestreo al azar por tabla de contingencias

III. RESULTADOS

Se probaron los supuestos del modelo, diseño de medidas repetidas, antes de realizar el análisis de la varianza.

Se realizaron gráficos, histogramas, verificando que los datos provenían de una población con distribución normal. Para cada residuo de las variables respuestas se realizó un QQ plot y un gráfico de histograma, para ser más certeros con respecto a la distribución normal de las respuestas, ya que los gráficos de QQ plot podían generar vacilaciones con respecto a la normalidad.

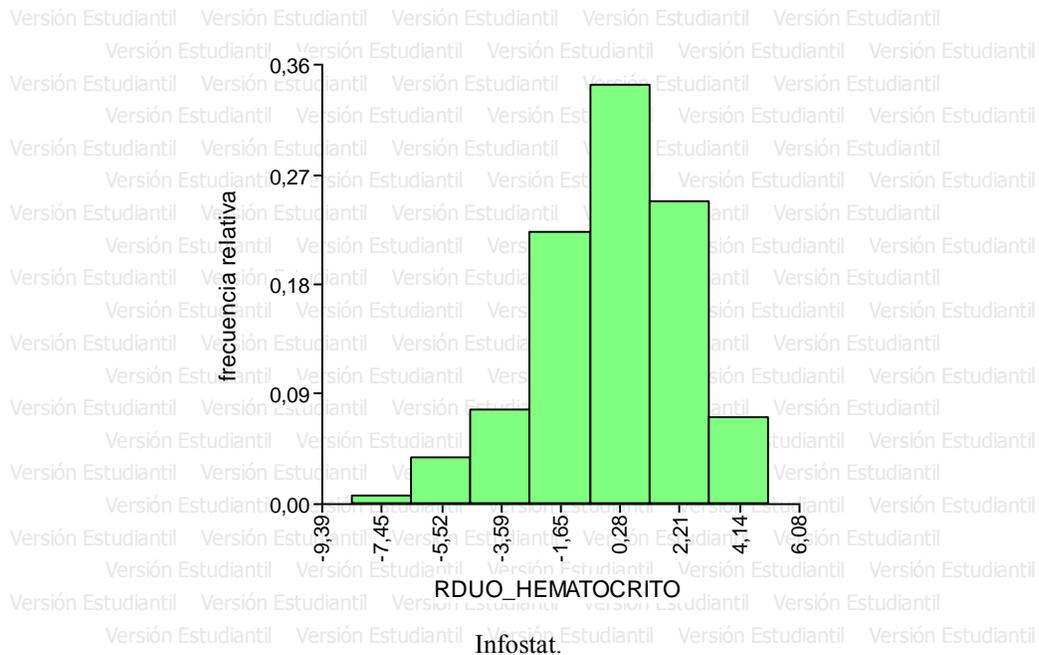
Gráfico 1: QQ plot- Residuos hematocritos



Infostat.

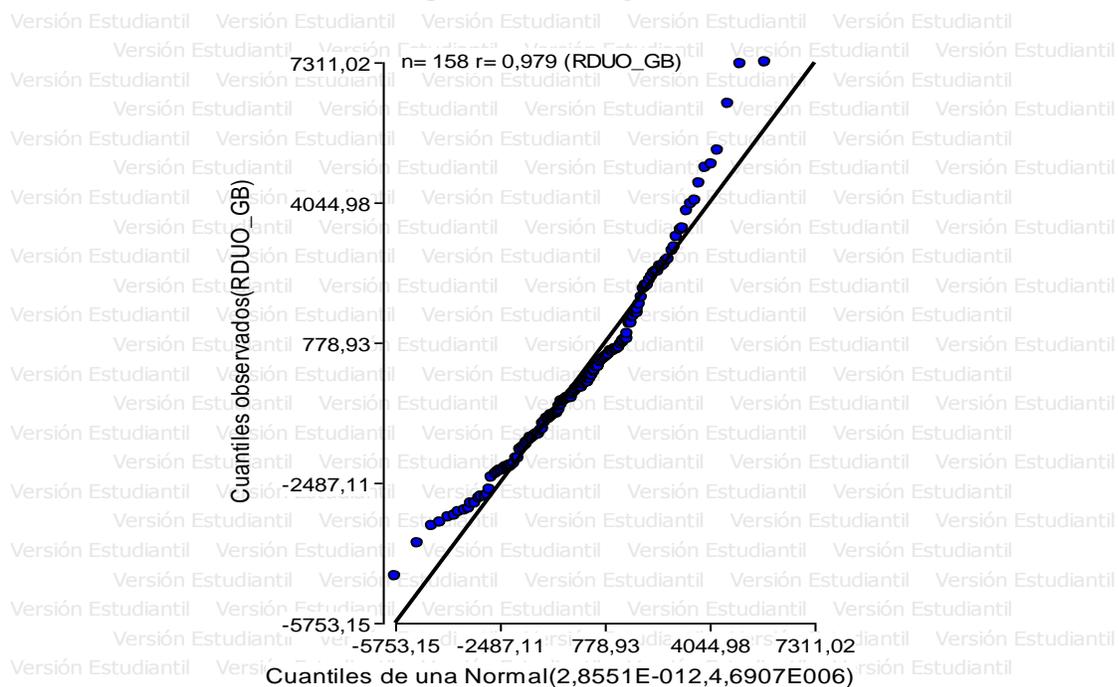
Fuente: Elaboración propia

Grafico 2: Histograma – Residuos Hematocrito



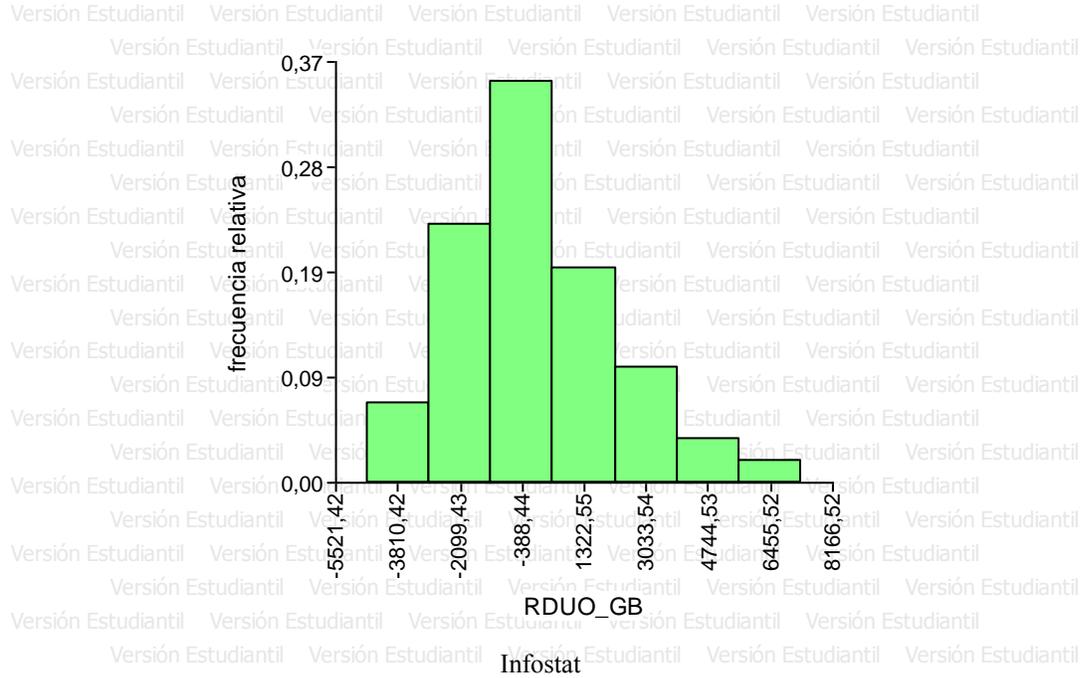
Infostat.
Fuente: Elaboración propia

Grafico 3: QQ plot- Residuos globulos blancos



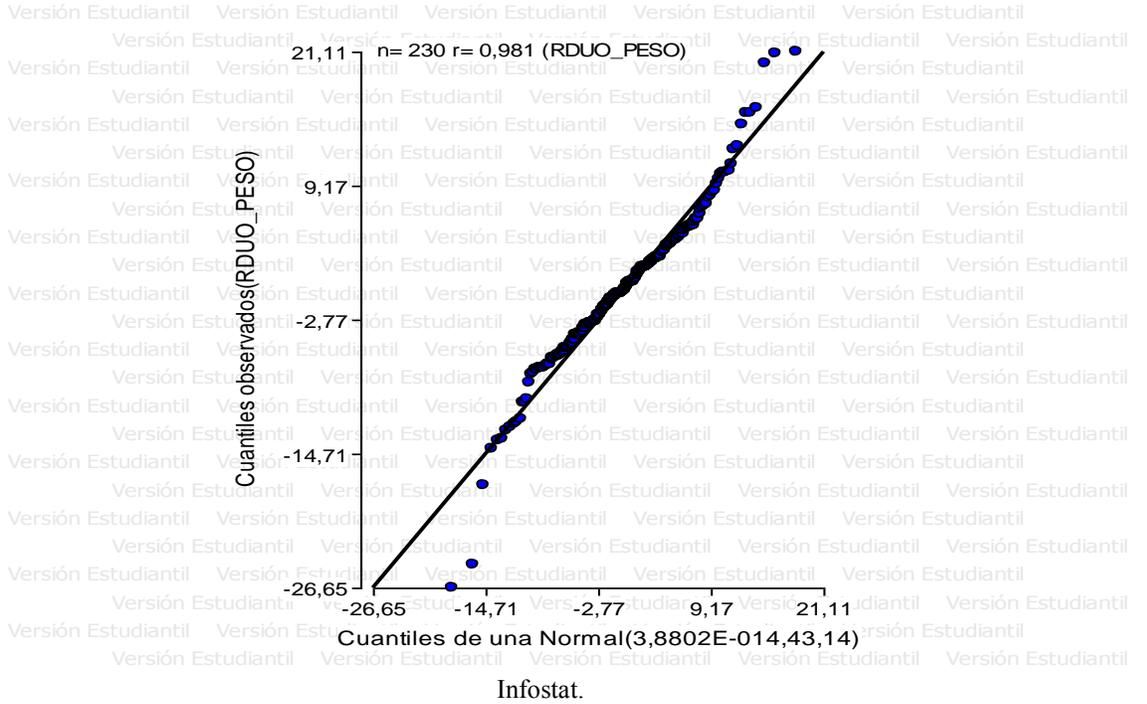
Infostat.
Fuente: Elaboración propia

Grafico 4: Histograma-Residuos glóbulos blancos.



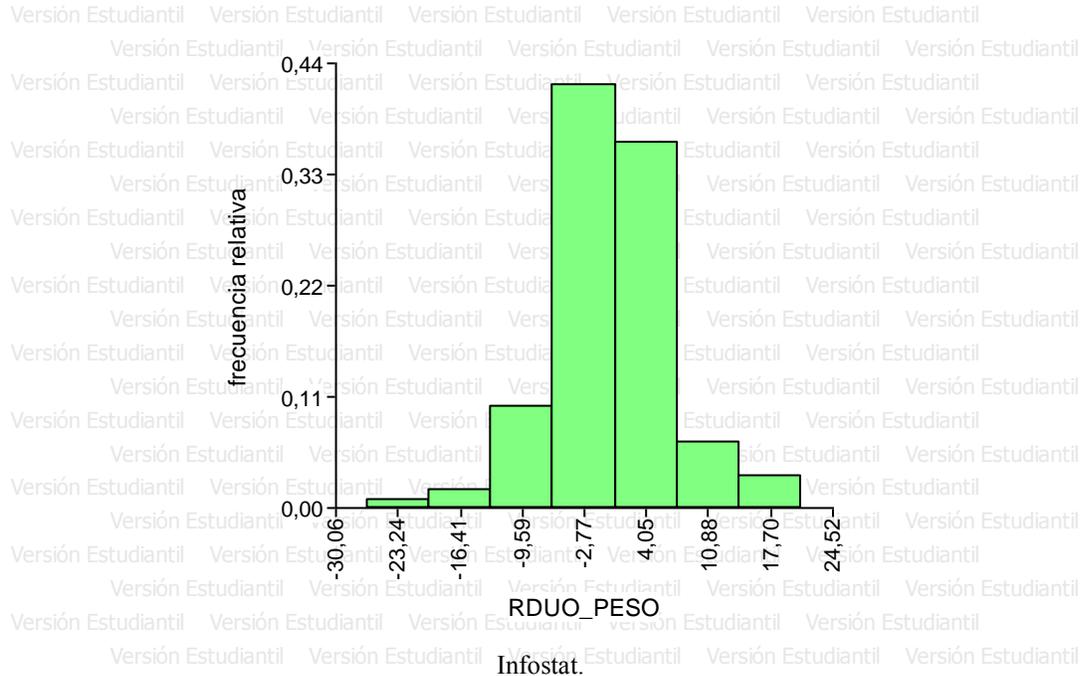
Fuente: Elaboración propia

Grafico 5: QQplot – Residuos peso



Fuente: Elaboración propia

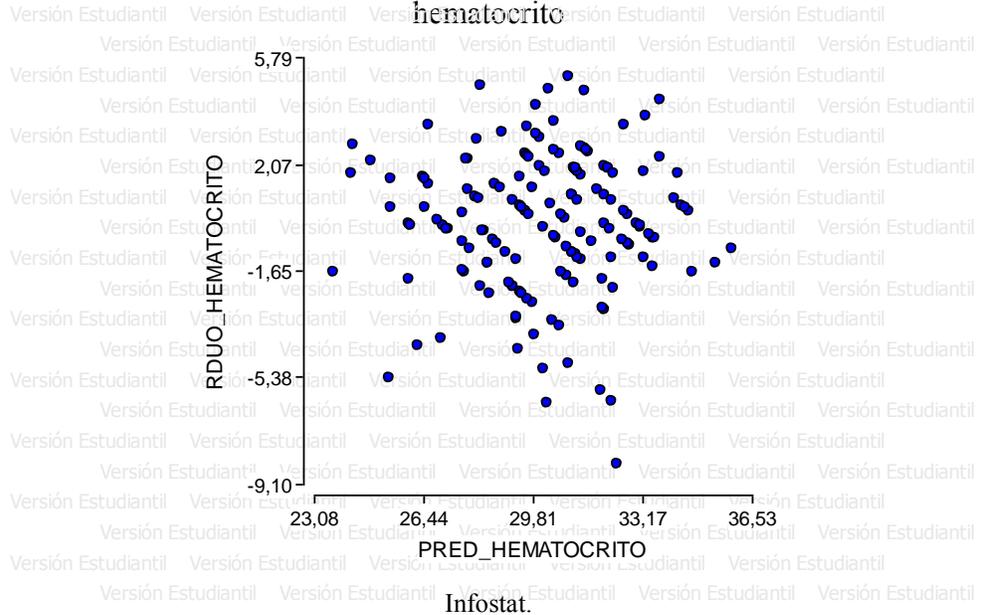
Grafico 6: Histograma-Residuos peso.



Fuente: Elaboración propia

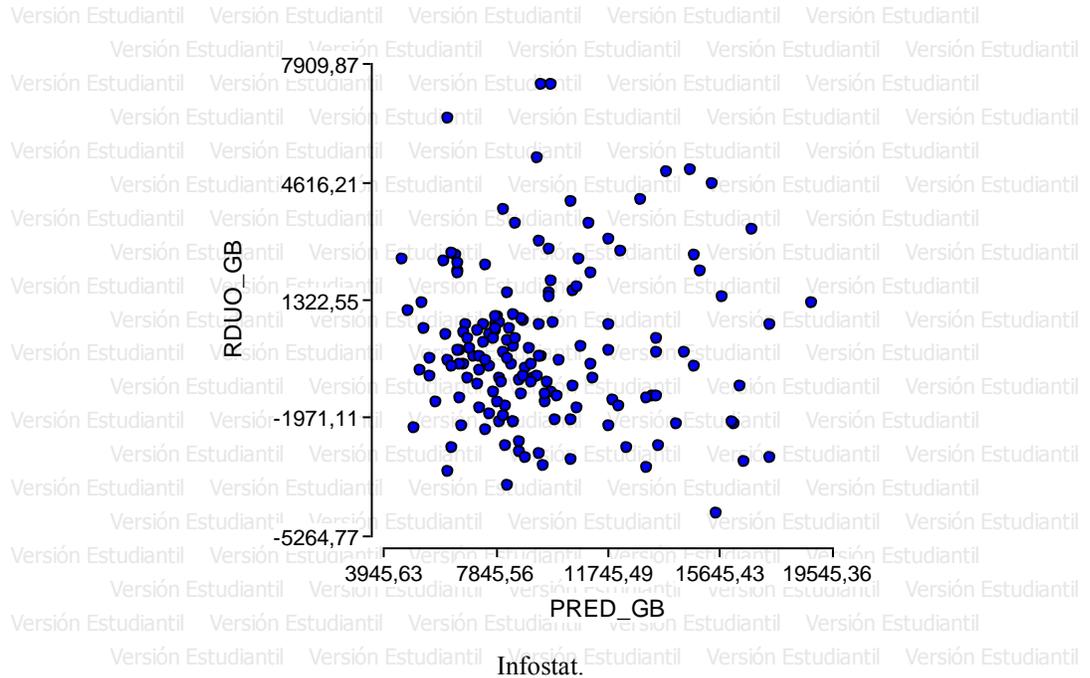
Se realizaron diagramas de dispersión verificando la homocedasticidad de los errores, para cada variable respuesta.

Grafico 7: diagrama de dispersión- residuos vs predichos para la variable hematocrito



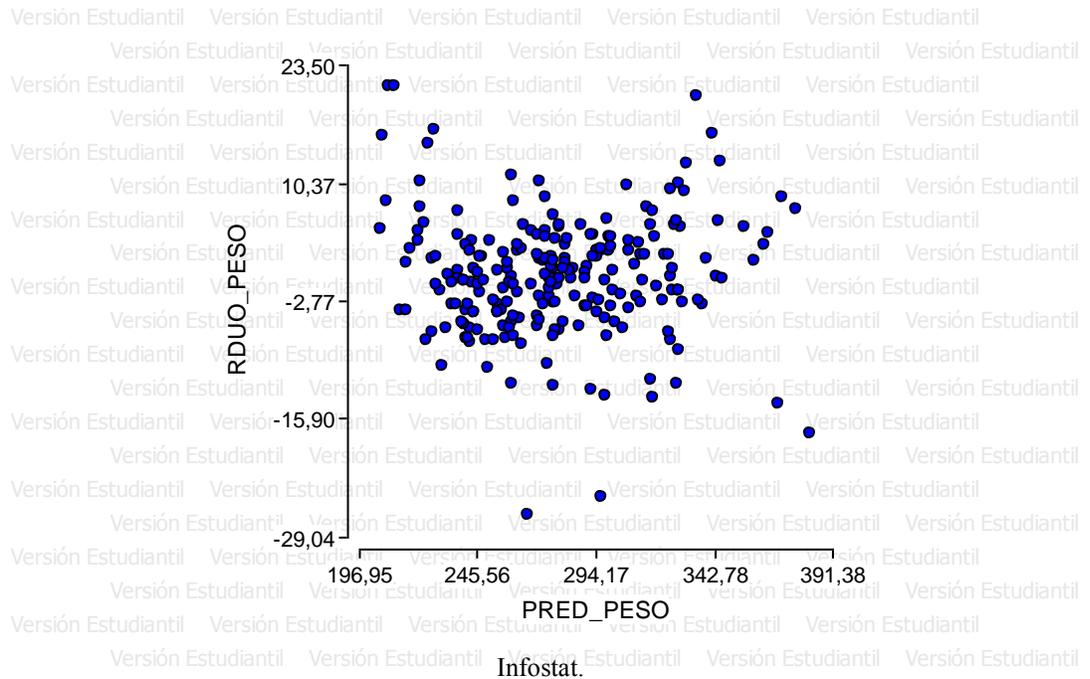
Fuente: Elaboración propia

Grafico 8: diagrama de dispersión- residuos vs predichos para la variable glóbulos blancos



Fuente: Elaboración propia

Grafico 9: diagrama de dispersión- residuos vs predichos para la variable glóbulos blancos



Fuente: Elaboración propia

Ya comprobados los supuestos, el análisis de la varianza dio como resultado lo siguiente:

a) Toma de sangre

Técnicas de laboratorio:

- Método del hematocritos

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HEMATOCRITO	158		0,51	0,31 9,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	920,86	45	20,46	2,56	<0,0001	
TRAT	143,76	2	71,88	4,45	0,0200	(TRATAMIENTO>ANIMALES)
TIEMPO	191,99	4	48,00	6,01	0,0002	
TRAT>ANIMALES	500,78	31	16,15	2,02	0,0040	
TRAT*TIEMPO	84,33	8	10,54	1,32	0,2411	
Error	894,86	112	7,99			
Total	1815,72	157				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,92847

Error: 16,1543 gl: 31

TRATAMIENTO	Medias	n	
BACTERINA	30,09	52	A
BACT + CITO	31,18	53	A
TESTIGO	32,00	53	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

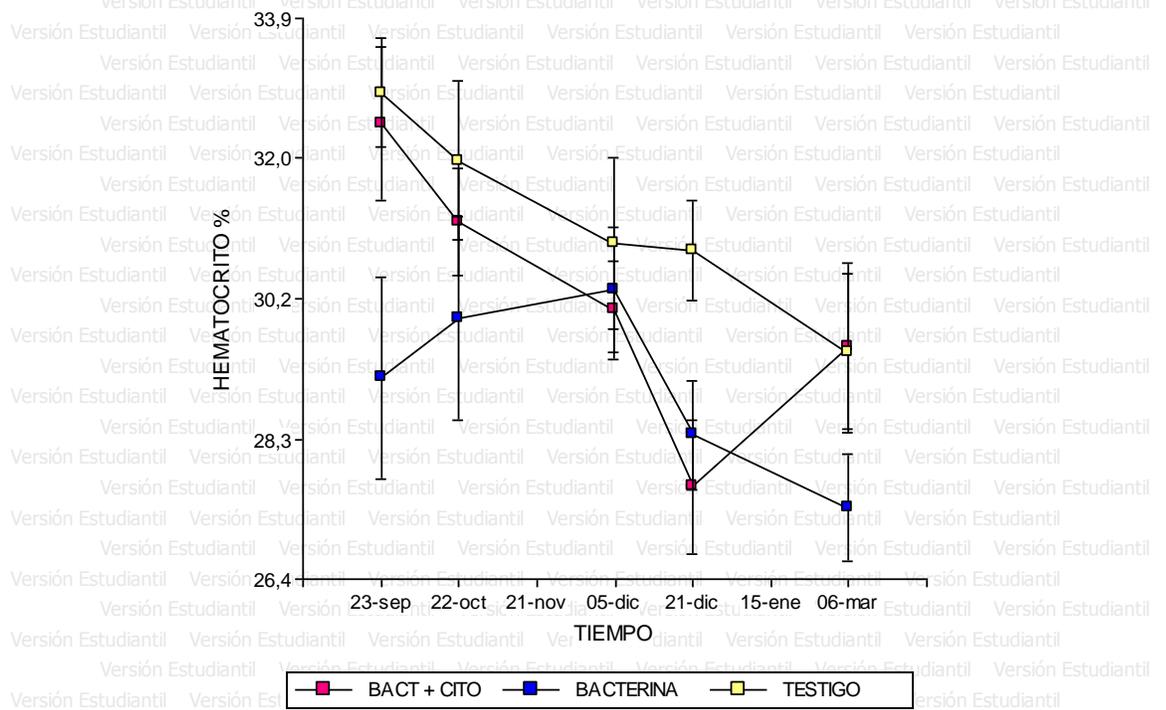
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,98058

Error: 7,9899 gl: 112

TIEMPO	Medias	n		
06-mar	28,58	30		A
21-dic	28,97	30		A
05-dic	30,45	32		A B
22-oct	31,12	33		B
23-sep	31,61	33		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

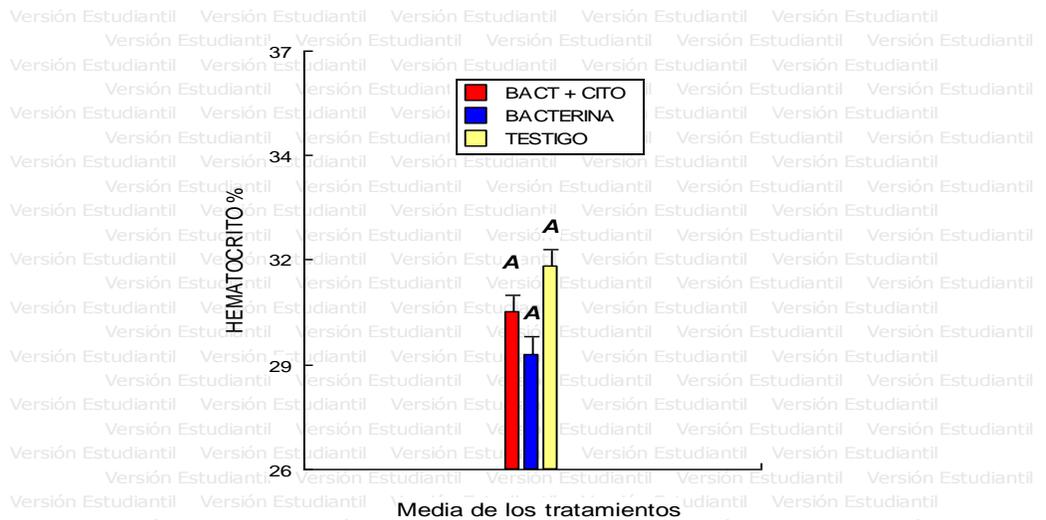
Grafico 10: Comparación del hematocrito para los diferentes tratamientos en función del tiempo.



Infostat.

Fuente: Elaboración propia

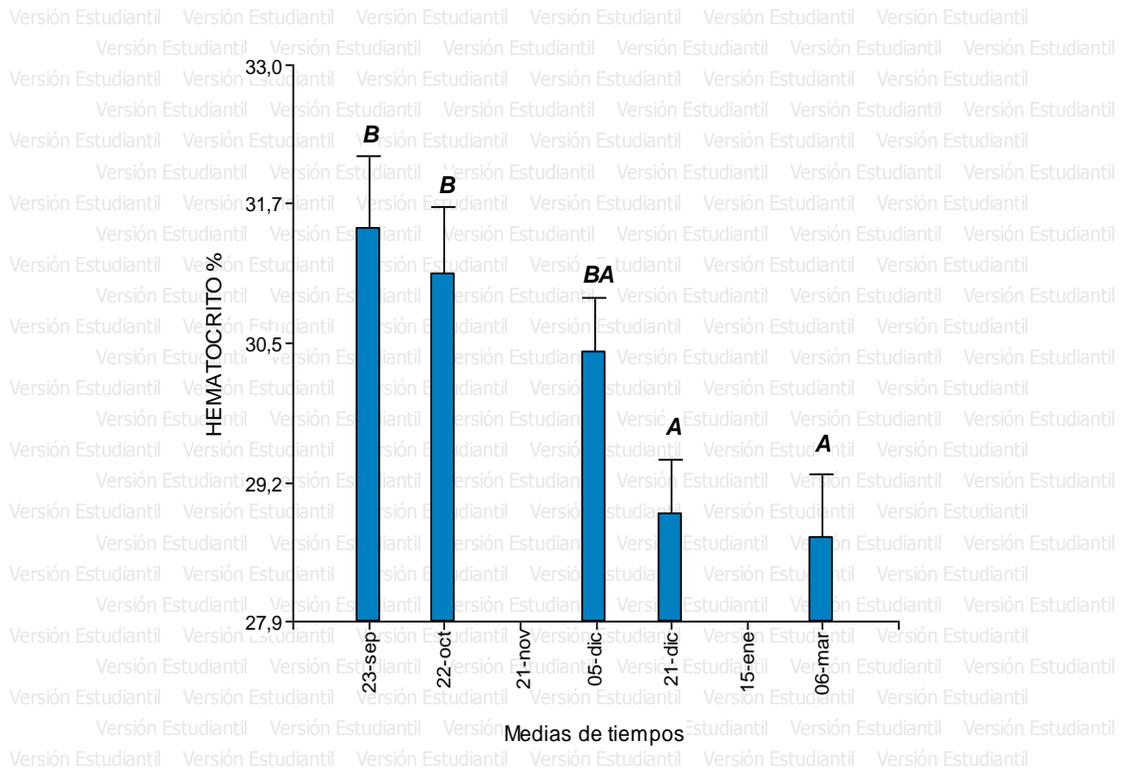
Grafico 11: Comparación del hematocrito para los diferentes tratamientos.



Infostat.

Fuente: Elaboración propia

Grafico 12: Comparación del hematocrito para los diferentes tiempos



Infostat.

Fuente: Elaboración propia

En base al diseño de medidas repetidas, se realizó un análisis de la varianza para la variable respuesta definida en el Hematocrito, no se encontró evidencia de interacción significativa entre los factores tratamiento y tiempo, en un primer momento se encontraron diferencias marginales ($p < 0,02$) entre los tres tratamientos para esta variable. Sin embargo al realizar el test de Tukey se halló que estas diferencias no eran estadísticamente significativas, teniendo en cuenta las medias de cada tratamiento (grafico 11). Si, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, a lo largo de las series cronológicas entre las diferentes fechas (Grafico 12). Estas diferencias entre la última fecha y la primera fue aproximadamente 3%, ocurriendo un descenso gradual desde el inicio del ensayo hasta el final, y con diferencias mínimas entre los días. Produciéndose este descenso en los tres tratamientos en forma similar.

- Recuento de glóbulos blancos

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GB	158	0,66	0,52	26,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	1410690098,58	45	31348668,86	4,77	<0,0001	
TRAT	43152350,69	2	21576175,35	1,89	0,1684	(TRAT>ANIMALES)
TIEMPO	968760041,50	4	242190010,37	36,83	<0,0001	
TRAT>ANI	354330906,12	31	11430029,23	1,74	0,0193	
TRAT*TIEMPO	44446800,27	8	5555850,03	0,84	0,5652	
Error	736439094,46	112	6575349,06			
Total	2147129193,04	157				

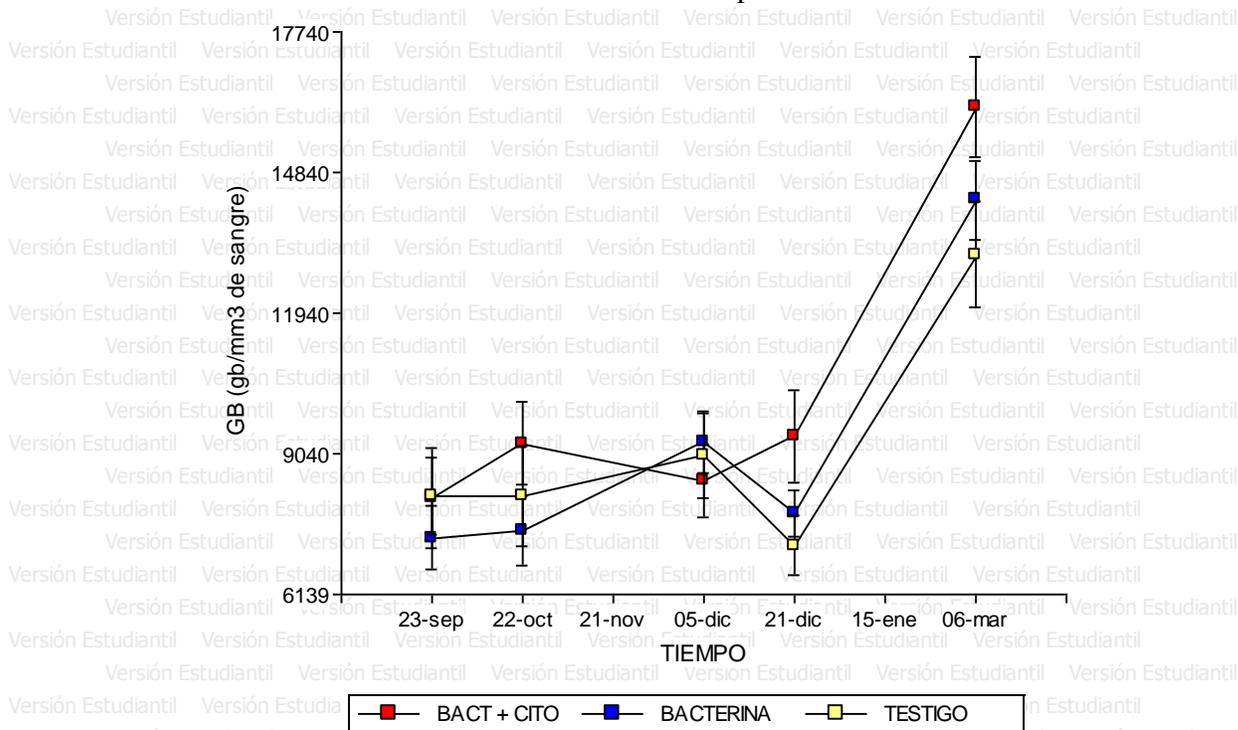
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1796,72986

Error: 6575349,0577 gl: 112

TIEMPO	Medias	n	
23-sep	7849,58	33	A
21-dic	8111,29	30	A
22-oct	8306,13	33	A
05-dic	8845,96	32	A
06-mar	14686,67	30	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Grafico 13: Comparación de los glóbulos blancos para los diferentes tratamientos en función del tiempo.

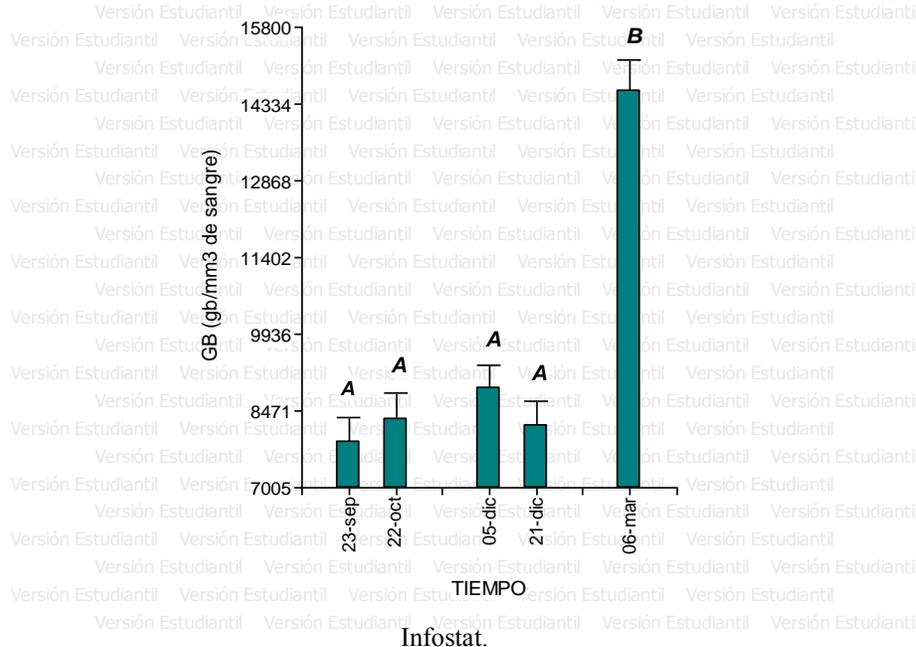


Infostat.

Fuente: Elaboración propia

Evaluación de la respuesta del conjugado citokina/bacterina inactivado de *Moraxella bovis* β hemolítica en bovinos con queratoconjuntivitis

Grafico 14: Comparación de los glóbulos blancos para los diferentes tiempos.



Fuente: Elaboración propia

Para la variable glóbulos blancos luego de no encontrarse evidencia de interacción significativa entre los factores tratamiento y tiempo se halló que no había diferencia estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, encontrándose diferencias significativas a lo largo de las series cronológicas, habiendo una diferencia entre el inicio del ensayo y el final, con un aumento en todos los animales de los tres tratamientos. (Grafico 13 y 14).

- Formula leucocitaria

La formula leucocitaria no se analizó estadísticamente, ya que el método adecuado a utilizar es demasiado complejo.

b) Determinación del peso vivo de las terneras

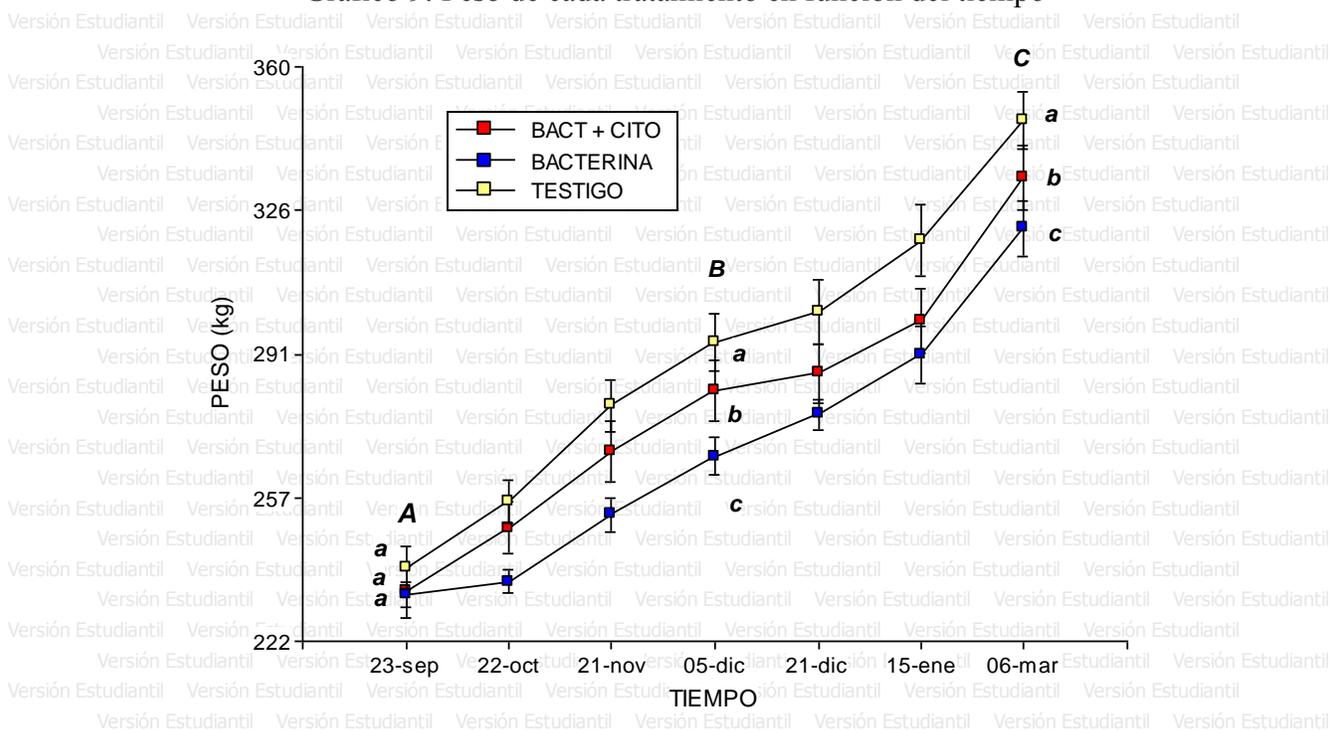
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PESO	230	0,97	0,96	2,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	322453,20	51	6322,61	113,92	<0,0001	
TRAT	18152,07	2	9076,03	3,47	0,0435	(TRAT>ANIMALES)
TIEMPO	220298,17	6	36716,36	661,55	<0,0001	
TRAT>ANIMALES	80993,01	31	2612,68	47,07	<0,0001	
TRAT*TIEMPO	3009,95	12	250,83	4,52	<0,0001	
Error	9879,08	178	55,50			
Total	332332,28	229				

Grafico 9: Peso de cada tratamiento en función del tiempo



Referencia: Donde la diferencia entre las letras mayúsculas es la diferencia entre los tres tiempos, y las letras en minúscula señalan las diferencias entre tratamientos para cada tiempo.

Infostat.

Fuente: Elaboración propia

Con respecto a la variable peso, se vio al realizar el análisis de la varianza que había interacción entre los factores tratamiento y tiempo, y que la diferencia entre los tratamientos era significativa ($p < 0,05$). Luego de estas evidencias, se efectuaron efectos simples para tres tiempos diferentes, uno inicial (23 de septiembre) un tiempo

medio (05 de diciembre) y el tiempo final (06 de marzo). Al inicio del ensayo como era de esperar no se encontró diferencia significativa entre los pesos de los animales para los tres tratamientos, encontrando diferencias en la fecha media y al final del ensayo. También se puede observar que hubo un aumento progresivo de peso en todos los grupos de animales sometidos a los diferentes tratamientos, manteniendo un paralelismo.

Se tiene en cuenta que la ganancia promedio de pesos estuvo influenciada por diferentes factores, como la receptividad del campo, condiciones de carga animal, manejo y condiciones climáticas desfavorables como fue la sequía 2008/2009. El ensayo se llevo adelante con una menor oferta forrajera. Teniendo todos estos factores un impacto directo sobre la interpretación de la diferencia de peso. Esa diferencia de peso, si bien se mantuvo en los distintos grupos a lo largo del ensayo, no se puede llegar a distinguir que fueran la explicación de la diferencia de los tratamientos.

Con lo expuesto se concluye, no se puede interpretar que las variaciones de peso sean atribuibles a los diferentes tratamientos, y sí por las externalidades negativas y positivas.

c) Hisopados

Los resultados que se obtuvieron con el método utilizado no fueron significativos, probablemente esto fue debido a la baja sensibilidad del método o a la dilución en 1 ml en PBS del hisopado obtenido en el campo, ya que no se encontraron concentraciones entre 50 y 400 mg/ 100 ml (rango del método).

d) Recuperación del patógeno

Se logro la recapturación del patógeno *M. bovis*, de los tres grupos; dos (2) recuperaciones del patógeno en el grupo bacterina, una (1) del grupo conjugado y del grupo testigo se recuperó de seis (6) animales. Coincidiendo estas colonias desarrolladas de *M. bovis*., con el perfil de identidad microbiológico expuesto anteriormente. En la siguiente tabla se muestran los animales que han dado positivos a *M. bovis*.

Muestra N°	Aislamiento <i>M. bovis</i>	Muestra N°	Aislamiento <i>M. bovis</i>
420	Negativo	430	Positivo
594	Negativo	426	Negativo
401	Positivo	416	Positivo
603	Negativo	428	Negativo
672	Negativo	408	Flora contaminante
429	Negativo	604	Negativo
409	Positivo	434	Flora contaminante
429	Negativo	427	Negativo
672	Negativo	602	Negativo
424	Flora contaminante	592	Negativo
729	Negativo	402	Positivo
421	Negativo	432	Negativo
598	Negativo	430	Negativo
599	Positivo	422	Flora contaminante
591	Negativo	430	Negativo
406	Positivo	433	Negativo
407	Negativo	404	Negativo
605	Positivo	596	Positivo

Los animales seis (6) con caravanas N° 409, 599, 406, 430, 416, 596 pertenecen al grupo testigo, Los dos (2) animales con caravanas N° 605 y 402 fueron inoculados con la bacterina y el animal con caravana N° 401 perteneció al grupo conjugado. Quedando demostrado que en el grupo testigo se pudo obtener la *M. bovis* en mayor número de casos.

e) pH^{11} en el film lacrimal

A lo largo del ensayo los valores arrojados en los muestreos de pH se mantuvieron entre 6 y 6, 5 de manera constante. No presentando diferencias entre los ojos lesionados y los ojos sanos.

f) Improntas

Los resultados obtenidos con las improntas no fueron significativos, ya que al analizar las observaciones celulares por microscopía directa no fueron relevantes.

¹¹ *pH* Indicador Strips, (0 – 14) code: 7.69735.96.3 -538534. MERCK EgaA.

g) Clasificación de las lesiones oculares

Como fue explicado anteriormente se realizaron en dos fechas diferentes observaciones en las estructuras corneales de las terneras, clasificando las lesiones encontradas de acuerdo al grado de manifestaciones, su severidad y magnitud, asignándole un puntaje o “score”.

Primera observación luego del inicio del desafío a las tres (3) semanas: de todos los animales sometidos al ensayo se observó que el 30 % presentaba lesiones evidentes en las estructuras oculares:

- a) En el grupo inoculado con bacterina (GA) presentó un (1) animal con lesión congestiva purulenta, nube y úlcera corneal. La severidad de la lesión fue en ambos ojos. El score para este grupo fue de 4.50 puntos.
- b) En el GB (grupo con el conjugado) se registraron dos (2) animales con congestión conjuntival y nube corneal, en ambos casos fue afectado un sólo ojo. Para este grupo la magnitud y severidad de las lesiones no fueron clínicamente significativas logrando un score de 1.50 puntos.
- c) El grupo testigo (GT), se registró un (1) animal con úlceras corneales severas bilaterales logrando un score de tres (3) puntos.

Se puede concluir que los tres grupos presentaron lesiones en alguna de las estructuras oculares, en el grupo testigo, estas lesiones fueron más evidentes y severas. Y de los animales inmunizados el grupo bacterina presentó lesiones de mayor severidad. El grupo con el conjugado tuvo lesiones menores, presentándose en un sólo ojo nubéculas y congestiones oculares.

La segunda observación se realizó a los cuarenta y cinco (45) días después de iniciado el desafío, encontrándose:

En esta ocasión del total de los animales un valor superior al 45% presentó lesiones de distinta magnitud en sus estructuras oculares:

- a) El grupo GA (con bacterina) presentó cuatro (4) animales, dos (2) úlceras bilaterales, uno (1) con conjuntivitis mucopurulenta y otro con nubes corneales bilaterales. El score fue de 11.50 puntos.
- b) En el grupo GB (con conjugado) se encontró un (1) animal con úlcera corneal unilateral y otro con nube corneal también en un sólo ojo. Este grupo presentó lesiones en menor número de animales y de menor magnitud y severidad que los otros grupos, el puntaje asignado fue de 5.50 puntos
- c) El grupo GT (testigo) presentó nueve (9) animales con lesiones severas, desde congestión mucopurulenta a úlceras corneales. Dos (2) animales con úlcera corneal, uno (1) con opacidad corneal completa, dos (2) con nubes corneales y cuatro (4) con conjuntivitis purulenta. En todos los

casos las lesiones fueron bilaterales. En este caso el puntaje para este grupo fue 15 puntos.

Score:

	GA	GB	GT
1ª Observación	4.50	1.50	3
2ª Observación	7	4	12
Puntaje total	11.50	5.50	15

Tabla de puntaje establecido de acuerdo a severidad y magnitud lesional

Observando el puntaje total que obtuvieron los diferentes grupos a lo largo del ensayo podemos ver una tendencia en las lesiones (manifestaciones clínicas), demostrando que el grupo inoculado con el conjugado (bacterina + citocina) tuvo una mejor respuesta inmune local con respecto a los dos grupos restantes.

Figura 12: Congestión conjuntival



Fuente: imágenes propias

Figura 13: Ulcera corneal



Figura 14: Nube corneal



Fuente: imágenes propias

IV. DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo experimental se buscó evaluar la eficacia preventiva del conjugado bacterina/citocina recombinante humana utilizado como método preventivo ante la infección experimental con cepas patógenas de *Moraxella bovis*. Comparándolo frente a un grupo inmunizado con bacteria y un grupo testigo, analizando primordialmente el comportamiento de inmunidad local y sistémica.

Las lesiones oculares fueron halladas en los tres grupos involucrados en el ensayo. En la primer observación, a las tres semanas del desafío el 30 % de los animales presentaban lesiones, a los 45 días del desafío, el porcentaje de manifestaciones clínicas había aumentado a un 45 % y estas lesiones eran más severas y de mayor magnitud. Las lesiones más importantes fueron halladas en el grupo sin tratamiento.

Los resultados estadísticos, respecto al recuento de glóbulos blancos permitieron observar la ausencia de diferencia entre los tres grupos, teniendo en cuenta la recaptación del patógeno y las manifestaciones clínicas donde el grupo no inmunizado, el grupo testigo presento mayor severidad y magnitud en las lesiones. Se puede inferir observando los valores de los recuentos de glóbulos blancos que las diferencias no son estadísticamente sensibles pero si se puede considerar diferencias desde el punto de vista biológico.

V. CONCLUSIONES

Son muchos los indicios que hay que observar para llegar a una conclusión, ya que se realizaron muchas pruebas, por esta razón en el caso de los resultados obtenidos de las series blancas donde las diferencias estadísticas no eran significativas, se concluyó que desde el punto de vista biológico se considera una diferencia entre los tres tratamientos, indicando que en el grupo con el conjugado se obtuvo un recuento de glóbulos blancos mayor, siguiendo el grupo tratado con la bacterina y por último el grupo testigo fue el que menor recuento tuvo. Esto nos revela que los grupos inmunizados tuvieron mayor reacción celular y el grupo tratado con la bacterina y citocina se diferenció teniendo una mayor estimulación de la respuesta inmunitaria, siendo el grupo testigo el que menor estimulación tuvo. Se llega a esta conclusión teniendo en cuenta también que el grupo del conjugado tuvo un menor número de animales afectados al compararlos con el grupo testigo y el grupo bacterina, comprobado esto con las lesiones encontradas, y con la recuperación del patógeno y su posterior desarrollo en el laboratorio. Concluyendo que el conjugado bacterina/citocina generó una respuesta de inmunidad local diferente a las prevenciones que anteceden.

Hay que tener en cuenta que los factores de esta enfermedad como ya se han mencionados, son muchos. El establecimiento donde se desarrolló este trabajo contaba con un plan sanitario contra IBR, un factor importante predisponente y que puede agravar un cuadro de queratoconjuntivitis.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch P., Bosch R. *Reconocimiento materno de la preñez en rumiantes*. Monografías de medicina veterinaria, vol. 19 N°1 y N°2. Rio Cuarto, Córdoba, 1997-1999.
2. Cobo A, Leaniz G y C Gil-Turnes. (1985) *Queratoconjuntivitis infecciosa bovina y queratoconjuntivitis ovina en el Uruguay XII Jornadas Uruguayas de buiatría*. Paysandú, R.O.U.
3. Coffin L. David. *Laboratorio clínico en medicina veterinaria*. 2da ed. Mexico. Editorial La Prensa Médica Mexicana, 1977. Pp 148-161.
4. George L. *Clinical infectious bovine keratoconjunctivitis* (1984) Comp. Cont. Educ. Pract. Vet., Vol6: S712-S720.
5. Kopecky K, Pugh G and T McDonald. *Infectious bovine keratoconjunctivitis: Contact transmission*. 1986. Am.J.Vet.Res., 47: 622-624.
6. Knop, Erich; Knop, Nadja. (Mar 2005) *The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection*. Journal Anatomy v. 206 (3): 271-285
7. Kopecky K, Pugh G and T McDonald. *Infectious bovine keratoconjunctivitis: Contact transmission* (1986) Am.J.Vet.Res., 47: 622-624
8. Fiorentino, A; Peralta, M; Odeón, A; et col. (2001) *Lesiones oculares en terneros con queratoconjuntivitis infecciosa bovina infectados experimentalmente y en forma natural con Moraxella bovis*. Revista de Medicina Veterinaria Vol. 82 N° 3: 166-170.
9. Ian R. Tizard. *Señalización celular: las citoquinas y sus receptores*. En Introducción a la Inmunología Veterinaria 8va ed. Ediciones El Sevier Español s.r.l 2009 pag.71-79.
10. Ian R.Tizard. *Fármacos y otros agentes que afectan al sistema inmune*. En Introducción a la inmunología Veterinaria 8va ed. Editorial El Sevier Español s.r.l 2009 pág. 487-488.
11. Lázaro, Reinaldo;González; Xiomara, Enrique; Betáncourt, A et col *Aislamiento de Moraxella bovis en terneros afectados de queratoconjuntivitis*. Veterinaria Tropical. 1993. Vol. 18: 39-44.
12. Nayar P.S.G., Saunders J.R. *Infectious Bovine Keratoconjunctivitis II. Antibodies in Lacrimal Secretions of Cattle Naturally or Experimentally infected with Moraxella bovis*. Diario Canadiense de investigación veterinaria, Vol. 39.Canada, Enero 1975.

13. Odeón, A. y Paolicchi, F., INTA Balcarce - Combessies, G., Laboratorio Azul S.A. - Margaritte, J., Biogénesis S.A. 2005. Expochacra. Documento INTA EEA Balcarce. Ruta 226 Km 73,5 (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina.
14. Paolicchi F, Casaro A y Odeón A. *Evolución de las lesiones oculares en bovinos infectados con Moraxella bovis*. 1998. Revista de Medicina Veterinaria. 79: 410 – 416.
15. Pugh GW Jr; Hughes, DE. *Bovine infectious keratoconjunctivitis: carrier state of Moraxella bovis and the development of preventive measures against disease*. American Journal Veterinary Association. 15;167(4): 310-3 Aug 1975
16. Pugh GW Jr; McDonald TJ; Larsen, AB. *Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: potentiation of a Moraxella bovis pilus vaccine's immunogenicity by vaccination with Mycobacterium paratuberculosis bacterin*. American Journal Veterinary Research 1986 Oct;39(10):1656-61
17. Schalm O.W., Jain N.C., Carrol E.J. *Hematología Veterinaria Argentina*. 1º ed., Argentina. Editorial Hemisferio sur s.a, 1981. Pp 42-63.
18. Taleisnik S. *Receptores celulares y la Transduccion de señales*. 1era ed. Argentina. Grupo Editor Encuentro, 2006. Pp 97-104.
19. Zielinski G., Descarga C., Piscietelli G. *Sanidad en invernada: Parasitosis gastrointestinal, queratoconjuntivitis infecciosa, enfermedades virales, plan sanitario*. Córdoba, 1997. Agro 2 de Córdoba cap. 6:141-164

Fuentes de información de internet:

1. Brandan N.. *Citoquinas*. Bioq. Quintana R., Aguirre de Avalos MV. [publicación en línea]: Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de medicina, 2002. Disponible desde internet en [Http://www.med.unne.edu.ar/catedra/bioquimicaanterior/citoquinas.pdf](http://www.med.unne.edu.ar/catedra/bioquimicaanterior/citoquinas.pdf). [con acceso el 03-05-2010].
2. Centro de Inmunoterapia Veterinaria® (CIV). <http://www.cancer-perros-gatos.com.ar/index.asp>
3. Gonzalez Álvarez R., Rodríguez Z., Alonso González Y. *Citocinas anti-inflamatorias y sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico*.

- [publicación en línea]. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 10 N°8, Agosto 2009. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080809.html> [con acceso 28-10-2010].
4. Quinteros Cornejo G. *Libro de enfermedades infecciosas*. [publicación en línea]. [México]. Queratoconjuntivitis infecciosa bovina, pág. 153-154. Disponible en internet en <Http://www.scribd.com/doc/20575568/Libro-enfermedades-infecciosas-en-veterinaria> [con acceso el 30-04-2010].
 5. Ferreira A., Schafield L. *Evaluación de la actividad de anticuerpos, interferon y células inmunocompetentes contra parásitos intracelulares*. Revista Avances en Medicina veterinaria, vol. 3 N°1 , Enero- Junio 1988 [publicación en línea]. Chile. Disponible desde internet en <Http://www.avancesveterinaria.unichile.cl> [con acceso el 28-04-2010].
 6. *Cómo funcionan las vacunas*. [publicación en línea]. Pfizer Animal Health. Revista hereford, Bs As. 2001. Disponible desde internet en <Http://www.produccion-animal.com.ar> [con acceso el 28-04-2010]
 7. [s.n]. *Efecto de la administración de un compuesto inmunomodulador como adyuvante en la vacunación frente a la enfermedad Aujeszky*. [publicación en línea]. Mayo, 2001. Disponible desde internet en <Http://www.e-campo.com/?event=news.print&id=BEE94D19-4EGF-11D5-9B2300010226AA51&> [con acceso el 03-04-2010]
 8. Instituto Químico Biológico. <http://www.iqb.es/farmacologia/notas/notas.htm>
 9. Informe laboratorio Schering veterinaria s.a. *Prevención de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina*. [publicación en línea]. Disponible desde internet en: <Http://www.produccion-animal.com.ar> [con acceso el 01-05-2010].
 10. Sánchez Vizcaíno. Curso de Introducción a la inmunología porcina 3 ed. [publicación en línea]. [España]. Cap. 6-8. Disponible desde internet en <Http://www.sanidad animal.info/cursos/inmunologia3> [con acceso 01-05-2010].
 11. Tapia J. *Sistema Inmune y Sistema Nervioso*. Cuadernos de Neurología, vol. XXII, 1997. [publicación en línea]. Disponible desde internet en: http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/1997/pub_18_97.html [con acceso el 22-10-2010].
 12. Vandeputte J. Información técnica para el médico veterinario. *Introducción a la Inmunología y Vacunología*. Mayo 2004. [publicación en línea]. Disponible desde internet en: <Http://www.webveterinaria.com/merial/inmunologia.pdf> [con acceso el 22-10-2010]

13. Zielinski G. *Queratoconjuntivitis Infecciosa bovina: Etiología, Patogenia e Inmunología*. Grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Marcos Juárez [publicación en línea]. 2005. Disponible desde internet en [Http://www.covetcba.com.ar/verarticulo.asp?id=967](http://www.covetcba.com.ar/verarticulo.asp?id=967) [con acceso el 30-04-2010].
14. Zielinski G. *El control de la queratoconjuntivitis*. INTA Marcos Juárez. [publicación en línea]. Revista Fleckvieh N° 77, 2000. Disponible desde internet en [Http://www.produccionbovina.com.ar](http://www.produccionbovina.com.ar) . [con acceso el 01-05-2010].