



**ADENDA AL CONVENIO ESPECÍFICO ENTRE LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
(FACULTAD DE CIENCIAS) Y LABORATORIOS VIRBAC MÉXICO S.A. DE C.V.**

En la ciudad de Montevideo, a los 11 días del mes de mayo de 2015, por una parte, la Universidad de la República (Facultad de Ciencias, en adelante la **Facultad**) representada por el Rector Dr. Roberto MARKARIAN y el Decano de la Facultad de Ciencias Prof. Juan CRISTINA, con domicilio en Av. 18 de julio 1968 de la ciudad de Montevideo; y por otra parte, Laboratorios VIRBAC México S.A. de C.V., Sucursal Argentina, representado en este acto por el Dr. Thierry David Gozlan, DNI 94542917, según certificado notarial expedido por el Esc. Mario Humberto Torres Verdín, con domicilio en Juan José Díaz N° 629 San Isidro, Provincia de Buenos Aires, en adelante: el **Laboratorio**, acuerdan la siguiente adenda al Convenio Específico entre la Universidad de la República (Facultad de Ciencias) y Laboratorios VIRBAC México de acuerdo al artículo Octavo del mismo.

**PRIMERO: ANTECEDENTES:**

I.- Con fecha 01 de setiembre de 2014, las partes suscribieron un convenio específico por el cual se generó un marco de actuación para la colaboración en la ejecución del proyecto "*Evaluación comparativa de la respuesta de anticuerpos IgG anti Fasciola en bovinos vacunados con diferentes vacunas experimentales de Fasciola hepática*".

II.- Es interés de las partes continuar el trabajo de investigación iniciado en esa oportunidad.

**SEGUNDO: OBJETO:** El objeto de esta adenda es la participación conjunta en el proyecto científico nombrado "Proyecto" en el Anexo 2, ampliando el objeto del convenio específico relacionado, el cual suscrito por las Partes, forma parte integrante de este convenio.

El "Proyecto" incluye contribución del Laboratorio y de la Facultad, descriptos a seguir en el párrafo Tercero.

**TERCERO: OBLIGACIONES DE LA FACULTAD:** Por el presente Convenio, la Facultad, por intermedio de la Facultad de Ciencias se obliga a:

- 1- Colaborar en la infección de los bovinos participantes con metacercarias de *Fasciola hepática*.

Exp.: 24011-000015-15

- 2- Realizar la cuantificación de anticuerpos anti-LAP en sueros de los bovinos.
- 3- Realizar el diagnóstico de animales experimentales infectados a través de la conducción de exámenes coprológicos para presencia de antígeno fecal de *Fasciola hepatica*;
- 4- Realizar la búsqueda post mortem de parásitos presentes a los efectos de determinar la capacidad protectora de las formulaciones vacunales.
- 5- Realizar reuniones periódicas con el Laboratorio, a los efectos de informar los avances y coordinar la realización de tareas conjuntas conducentes al logro de los objetivos del proyecto.
- 6- La realización de un informe final que incluya los resultados y conclusiones del proyecto de manera detallada.

#### **CUARTO: OBLIGACIONES DEL LABORATORIO :**

- 1) Financiar la realización de las tareas a realizar por la Facultad descritas en el párrafo SEGUNDO y en el Anexo 2, por un monto de U\$S 8.900.- (dólares americanos ocho mil y novecientos), a abonar en dos pagos de acuerdo al párrafo QUINTO.
- 2) Realizar las tareas complementarias necesarias para llevar adelante el proyecto, como mantenimiento y control de los bovinos, obtener las metacercarias infectantes, conducir la infección, obtener las muestras biológicas de sangre y heces, y realizar seguimiento clínico de los animales bovinos, sin excluir otras actividades necesarias para el logro de los objetivos del proyecto.
- 3) Suministrar la información técnica disponible en la empresa que pueda contribuir a la ejecución del proyecto, así como proveer de asesoría a través de sus técnicos e investigadores.

#### **QUINTO: PRECIO:**

El Laboratorio se compromete a abonar a la Facultad por la realización de estas tareas, la suma de 8.900, (ocho mil e novecientos dólares estadounidenses), la cual se hará efectiva de la siguiente manera:

- 1) una primera entrega de U\$s 4.900 (cuatro mil y novecientos dólares estadounidenses), inmediatamente después de firmarse el Convenio;

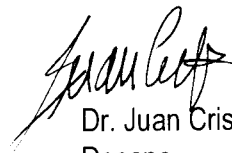
2) una última entrega de U\$s 4.000 (cuatro mil dólares estadounidenses) luego de recibidos los informes finales objeto de este convenio.

Para constancia y como prueba de conformidad, las partes firman 2 (dos) ejemplares del mismo tenor en el lugar y fecha arriba indicados.

Por la Universidad de la República



Dr. Roberto Markarian  
Rector



Dr. Juan Cristina  
Decano  
Facultad de Ciencias



Por el Laboratorio  
Dr. Thierry David Gozlan

Laboratorios VIRBAC Mexico S.A. de C.V.  
Sucursal Argentina

## PROTOCOLO DE ESTUDO DE EFICACIA

**Título del Estudio:** Evaluación comparativa de la respuesta de anticuerpos IgG anti-*Fasciola* em bovinos vacunados con diferentes vacunas experimentales contra *Fasciola hepatica*

**Redactado por:** Andre A. Cutolo  
Date: 3/Dic/14

**Revisado por:** Carlos Carmona  
Date: 3/Dic/14

Eduardo Reolon  
Date: 3/Dic/14

Gustave Decuadro  
Date: 3/Dic/14

**1 TITULO:**

*Evaluación comparativa de la respuesta de anticuerpos IgG anti-Fasciola em bovinos vacunados con diferentes vacunas experimentales contra Fasciola hepatica.*

**2 CONTATOS:****2.1 Representante del patrocinador:**

Andre A. Cutolo, DVM.  
Southern Hemisphere Innovation Project Manager  
Email: [andre.cutolo@virbac.com.br](mailto:andre.cutolo@virbac.com.br)

**2.2 Investigador Principal:**

Carlos Carmona García, DM  
Profesor de la Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica  
Email: [ccarmona@higiene.edu.uy](mailto:ccarmona@higiene.edu.uy)

**2.3 Investigadores Asistentes:**

Eduardo Reolon, Lic  
Gerente de Investigación y Desarrollo  
Email: [reolon@santaelena.com.uy](mailto:reolon@santaelena.com.uy)

Gustave Decuadro, DVM  
Corporate Marketing Southern Hemisphere Ruminants  
Email: [gustave.decuadro@virbac.com.mx](mailto:gustave.decuadro@virbac.com.mx)

**2.4 Monitor:**

Adriana Drocco, DVM.  
Asistente Técnica  
Email: [drocco@santaelena.com.uy](mailto:drocco@santaelena.com.uy)

Laboratorios VIRBAC México S.A de C.V. Sucursal Argentina  
Juan José Díaz 629, San Isidro, CP 1642  
Buenos Aires, Capital Federal, Argentina.  
Tel: +54(11) 4707-0131/4742-0950/4732-3436

**3 Local del Estudio:**

Los animales serán mantenidos y manejados en el Rancho Macondo ( Rancho Experimental de Laboratorios Santa Elena), ubicado en Florida, Uruguay.

#### 4 Objetivo:

##### 4.1 Objetivo:

El objetivo principal de este anexo 2 del ensayo es evaluar la capacidad inmunoprotectora de la vacuna basada en el antígeno LAP (leucina aminopeptidasa) en los bovinos vacunados con diferentes formulaciones de adyuvantes tal como está descrito en el Anexo 1 del presente convenio.

##### Resumen

Treinta bovinos hembras europeos o mestizos, entre seis y ocho meses de edad, libres de infección por *Fasciola hepatica*, fueron seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos en el Anexo y se dividieron en grupos de cinco animales cada uno. Los animales recibieron inmunización con LAP combinada con diferentes adyuvantes: Adyuvac 50 (Grupo 1), Montanide ISA 50V2 (Grupo 2), Alhydrogel 2% (Grupo 3), Alhydrogel + Ultracorn UC3 (grupo 4) y Alhydrogel + Ultracorn UC1 (grupo 5). El grupo control (Grupo 6) no recibió ningún tratamiento. Los animales de los grupos 1 a 5 recibieron la vacuna los días 0, 30 y 150 del ensayo (Anexo 1). En el día 250 los animales serán desafiados con una dosis de 500 metacercarias de *Fasciola hepatica* vía oral. Los animales se sangrarán en los días 250, 265, 280, 295, 310, 325 y 350 con el fin de medir la cantidad de anticuerpos contra antígenos LAP en el suero por medio de una prueba de ELISA. Los animales se pesarán los días 250, 295 y 350 a los efectos de determinar diferencias eventuales en la ganancia de peso entre los animales de los distintos grupos inmunizados y el control no vacunado. El día 350 los bovinos serán enviados a faena en un frigorífico registrado y los hígados y vesículas biliares serán recogidos y derivados al laboratorio de la Unidad de Biología Parasitaria donde se realizará el conteo de los gusanos presentes así como se los medirá y pesará. De esta forma se determinará la protección brindada por la vacuna con los distintos adyuvantes respecto al grupo no inmunizado y de los grupos inmunizados entre sí. A su vez se determinará la existencia de una eventual correlación inversa entre los títulos de anticuerpos anti-FhLAP y las cargas parasitarias a nivel individual.

## 5 Cronograma

Inicio fase animal:  
Diciembre/14.

Final de la fase animal:  
Abril/14.

### 5.1 Descripción del Cronograma.

Fecha Estudio	Muestreo Fecal	Muestreo de Sangre	Pesaje	Infección	Necropsia
D+250	•	•	•	•	
D+265		•			
D+280		•			
D+295		•	•		
D+310		•			
D+325	•	•			
D+350		•	•		•

## 6 ANIMALES DEL ESTUDIO:

Ver anexo 1.

## 7 CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION AND REMOCION:

Ver anexo 1.

## 8. INFECCION

Los animales se desafiarán con una dosis de 500 metacercarias de *Fasciola hepatica* con cubierta externa, producidas por el DILAVE (MGAP, Uruguay). Las metacercarias serán traídas al laboratorio de la Unidad de Biología Parasitaria para estudiar su viabilidad y preparar las dosis infectantes en papel de filtro. Se prepararán las dosis infectantes de acuerdo al diámetro de la sonda esofágica a utilizar en el proceso de infección.

## **9. EVALUACIÓN DE EFICACIA:**

### **7.1 Muestras de Sangre**

Ver Anexo 1

### **7.2 Evaluación cualitativa y cuantitativa de la respuesta de anticuerpos:**

Ver Anexo 1

### **7.3 Procedimiento para la cuantificación de anticuerpos anti-LAP:**

Ver Anexo 1

### **7.4 Procedimiento para la determinación de carga parasitaria**

Los adultos de *Fasciola hepatica* se extraerán de los hígados de los bovinos del ensayo por medio de una metodología estandar que incluye la apertura de los canaliculos biliares mayores e intermedios, la extracción manual de los gusanos alojados dentro de los mismos, el corte del parénquima hepatico en laminas de unos 2cm de diámetro, la incubación en PBS a temperatura de 30 C por 2 horas y el posterior tamizaje del medio de incubación a los efectos de retener los gusanos de menor tamaño. El número total de parásitos recuperados es la suma de los gusanos enteros más el número mayor de colas o cabezas recuperadas en el procedimiento.

Los gusanos recuperados se miden en su largo y ancho y se pesan agrupados aquellos provenientes de cada hígado para establecer la biomasa parasitaria.

### **7.5. Procedimientos para la determinación de coproantígenos de *Fasciola hepatica*.**

Los días 250 y 325 se relizará la extracción de materias fecales que luego se procesarán para el estudio de coproantígenos de *Fasciola hepatica* empleando para ello un kit diagnóstico de la empresa BIO-X (Francia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El análisis del día 250 tiene como objetivo determinar la ausencia de infección por *Fasciola hepatica* al momento de la infección y el del día 325 (10 semanas post infección) tiene como objetivo cuantificar indirectamente la carga parasitaria previo a la necropsia.



## **8 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGIA ANALITICA:**

### **8.1 Diferencias en los títulos de anticuerpos:**

Se comparará el OD promedio de los títulos de anticuerpos entre los diferentes grupos en los diferentes momentos de sangrado y será utilizado un método estadístico para tanto, considerándose las diferencias significativas con el valor de  $p < 0,05$ .

### **8.1 Diferencias en datos parasitológicos y correlación entre carga parasitaria y títulos de anticuerpos**

Se calcularán los promedios aritméticos de las cargas parasitarias. El porcentaje de protección será calculado según la fórmula  $((u-v)/u) \times 100$  donde  $u$  es el valor promedio del grupo control y  $v$  es el valor promedio del grupo vacunado. Las diferencias significativas entre los grupos vacunados y control serán estudiadas por el test de Dunnett mientras que la comparación entre los diferentes grupos vacunados será testada por análisis de varianza de una mano seguido del test de Turkey. Cualquier diferencia será considerada significativa con valores de  $p$  iguales o menores a 0.05. Dos test no paramétricos de correlación ( Spearman y Kendall ) se emplearán para determinar la asociación inversa entre los títulos individuales de anticuerpos anti-FhLAPr a distintos tiempos del ensayo y las cargas parasitarias

## **9 BIENESTAR ANIMAL:**

Durante la conducción del estudio será implementado un sistema de vigilancia y gestión adecuados con el objetivo de evitar cualquier estrese innecesario entre los animales del estudio, incluidos allí los procedimientos de restricción física, la administración y la inyección de productos de prueba, muestreo biológico, la alimentación, la vivienda y la evaluación clínica de los bovinos. Los animales serán faenados en un frigorífico de plaza de acuerdo a los procedimientos autorizados por las autoridades sanitarias del MAGP.

## **10 REPORTE FINAL DEL ESTUDIO:**

### **10.1 Reporte de las fases animal y laboratorial:**

El investigador principal es responsable por la preparación del informe final incluyendo el material y métodos, procedimientos y resultados de la prueba. El informe final será emitido dentro de los 30 días de la necropsia.

## Annex

## Virbac code of animal care

### A GLOBAL COMPANY DEDICATED TO ANIMAL HEALTH

For over 40 years, Virbac's mission has been to prevent and treat animal diseases including those with potential zoonotic impact. To that end, the organisation has made the moral and legal commitment to provide safe and efficacious products intended for all animal species.

In order to comply with regulations and to provide safe and efficacious products, Virbac as with all pharmaceutical companies, is required to conduct animal testing in very specific cases: when necessary and where there is no approved alternative method. Virbac favours the use of alternative methods wherever possible and encourages initiatives which aim to replace, reduce or refine animal testing.

To ensure the implementation of these principles, Virbac has developed and adopted the following code which applies to all Virbac employees and external partners:

### CODE

1. Regulations as well as scientific and ethical frames of reference relating to animal testing must be applied.
2. The international 3Rs principles (Reduce, Refine, Replace) - Reduce the number of animals, Refine accommodation and usage conditions, Replace with alternative tests - must always be followed.
3. The best standards of animal care and testing must be followed.
4. Tests must be designed with the aim of minimising the impact on the animals and all measures must be taken to reduce the discomfort, distress and suffering of the animal.
5. All tests must be reviewed for ethical assessment prior to implementation.
6. All animals must come from sources approved by the authorities and be transported according to regulations in force.
7. The skills, qualifications and ethical training of all staff involved in animal testing must be documented.
8. Whenever possible, development of new alternative methods or implementation of existing alternative methods must be favored.
9. When tests are carried out in veterinary clinics on domestic animals or livestock, appropriate standards of animal welfare must be complied with.
10. This code applies to all Group staff and external partners including specific sub-contractors, research bodies and suppliers. These external partners must comply with the spirit and the letter of this code when providing services to Virbac.