

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS
BOVINA ENZOÓTICA (BLV) Y LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTE LA
VACUNACIÓN CONTRA FIEBRE AFTOSA Y *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*”**

por:

VALERIA da SILVA SENA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinaria
Orientación: Medicina Veterinaria


MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN

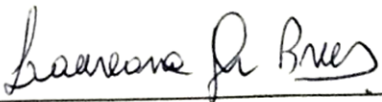
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



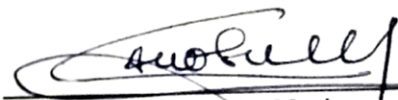
Dr. Gustavo Maldini

Segundo miembro (Tutor):



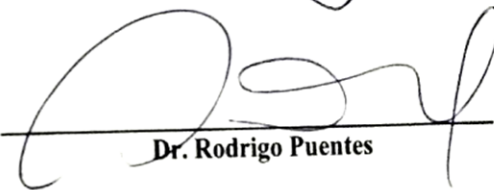
Dra. Laureana De Brun

Tercer miembro:



Dr. Carlos Morón

Cuarto miembro:



Dr. Rodrigo Puentes

Fecha:

_____ **7/12/2018** _____

Autor:



Valeria da Silva Sena

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora y amiga Dra. Laureana De Brun, por apoyarme en este trabajo, por confiar y dedicar su tiempo y conocimientos, ayudarme en mi formación profesional y sobre todo saber cultivar la paciencia.

A mi Cotutor Dr. Rodrigo Puentes por apoyarme y brindarme sus conocimientos y fortalecer mi formación profesional.

A la Dra. Agustina Algorta por su apoyo incondicional en las actividades del estudio.

Al campo de recría por darnos la posibilidad de realizar este trabajo y su interés en el mismo.

Al veterinario Dr. Gustavo Sacco y al personal del establecimiento, por su disponibilidad y ayuda durante las prácticas de este ensayo.

A Rodrigo Silva de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais-Brasil, por brindar sus conocimientos, materiales y espacio para la realización de Seroneutralización (SN) *in vitro* en células MDCK.

A Alejandra Capozzo y Florencia Mansilla, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, por brindar sus conocimientos, materiales y espacio para la detección de anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa (VFA).

A la Agencia de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión de investigación y desarrollo científico (CIDEC) de la Facultad de Veterinaria - Universidad de la República por financiar este proyecto.

Gonzalo Suárez por su ayuda en análisis estadístico.

Al personal de biblioteca de facultad por su dedicación en la búsqueda de material.

A los equipos de trabajo del Parque Lecocq, el Área de Extensión de Facultad de Veterinaria y mis tutores del practicantado de anestesia, Grazziana Cigliuti y Pablo Malet por apoyarme en el proceso de formación.

A la Asociación de Estudiantes de Veterinaria (AEV-ASCEEP-FEUU) por brindarme apoyo, confianza, formación y un grupo humano formidable.

A mis seres queridos, familia, amigos y amigas, compañeros y compañeras presentes y no presentes que me acompañaron durante todos estos años de esfuerzo creyendo en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
0. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	6
1. RESUMEN	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
4.1. LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA	11
4.1.1. Descripción del agente	11
4.1.2. Epidemiología: situación a nivel Mundial, Regional y Nacional	12
4.1.3 Formas de transmisión del agente	15
4.1.4. Patogenia y manifestaciones clínicas	16
4.1.5. Diagnóstico de la enfermedad	17
4.1.6. Tratamiento, control y prevención de la enfermedad	19
4.2. CLOSTRIDIOS	19
4.2.1 Descripción del agente	19
4.2.2. Epidemiología	20
4.2.3. Diagnóstico, Control y Prevención	21
4.3. FIEBRE AFTOSA	21
4.3.1. Descripción del agente	22
4.3.2. Epidemiología	22
4.3.3. Diagnóstico, Control y Prevención	23
4.4. RESPUESTAS INMUNITARIAS	24
4.4.1. Respuesta inmune a BLV en el hospedador	24
4.5. VACUNACIÓN	26
4.5.1. Inmunización contra Clostridios	27
4.5.2. Inmunización contra Fiebre Aftosa	28
4.5.3. Inmunizaciones contra diferentes enfermedades en bovinos infectados con BLV	29
5. HIPÓTESIS	30
6. OBJETIVO GENERAL	30
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1. Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas	31
8.2. Toma de muestras y grupos de ensayos	31
8.3. Vacunas empleadas	32
8.4. Hemograma	32
8.5. ELISA para la detección de anticuerpos contra BLV (IDEXX Laboratories, Inc., USA)	32
8.6. ELISA para la detección de la toxina alfa, beta y épsilon de Clostridium perfringens (Bio – X Diagnostics, Belgium):	32
8.7. Seroneutralización (SN) in vitro para detección de anticuerpos neutralizantes anti-toxina epsilon de Clostridium perfringens	33

8.8. ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) para la determinación del título de anticuerpos estructurales contra el Virus de Fiebre Aftosa (VFA).	33
8.9. ELISA para la determinación de IgG1 e IgG2 para VFA	34
8.10. ELISA para la determinación de IgM para VFA	34
8.11. ELISA de avidéz en dilución simple	34
8.12. Elaboración de registros y análisis estadísticos	34
8.13. Protocolo de experimentación animal	35
9. RESULTADOS	36
9.1.1. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los grupos BLV+ y BLV- de animales y resultado del hemograma	36
9.1.2. Respuesta de los animales a la vacunación contra <i>Clostridium perfringens</i>	36
9.1.3. Respuesta a los diferentes antígenos de <i>Clostridium perfringens</i> según status a BLV	38
9.1.4. Anticuerpos neutralizantes anti-toxina épsilon del <i>Clostridium perfringens</i>	38
9.1.5. Concordancia entre las técnicas para la detección de anticuerpos contra la toxina épsilon del <i>Clostridium perfringens</i>	39
9.2.1. Anticuerpos totales contra BLV y resultados de hemograma	39
9.2.2. Anticuerpos totales de VFA	40
9.2.3. Respuestas de isotipo frente a la cepa A24 / Cruzeiro	43
10. DISCUSIÓN	44
11. CONCLUSIÓN	49
12. BIBLIOGRAFÍA	50

0. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

0.1. Figuras

Fig. 1. Esquema de una partícula de BLV. Adaptado de Science, 1988, 240 1427-1434 (Gutiérrez, 2010).

Página 12

Fig. 2. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de clostridio.

Página 36

Fig. 3. Porcentaje de Inhibición anti *Clostridium perfringens*, determinado por ELISA de bloqueo.

Página 37

Fig. 4. Cinética de los títulos de anticuerpos para BLV de cada grupo de animales a lo largo del ensayo de Fiebre Aftosa medido por ELISA indirecto.

Página 39

Fig. 5. Cinética de los títulos de anticuerpos contra la cepa A24 / Cruzeiro en seronegativos a BLV, seropositivos a BLV y grupo seroconvertido.

Página 41

Fig. 6. Comparación de LPBE (a), isotipos (IgG1) (b), IgM (c), IgG2 (d) e índice de avidéz (e) contra la cepa A24 / Cruzeiro para BLV seronegativo, BLV seropositivo y el grupo que seroconvirtió el día 15 después de la vacunación.

Página 42

0.2. Tablas

Tabla 1. Grado de positividad para BLV según porcentaje de inhibición (% Inh).

Página 33

Tabla 2. Seroneutralización de la toxina épsilon.

Página 38

1. RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica es la principal virosis que afecta al ganado lechero en Uruguay. La infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune impactando directamente en la salud animal. El objetivo de este estudio fue investigar el impacto de la infección del virus de la leucosis bovina (BLV) frente a las inmunizaciones a campo contra *Clostridiumperfringens* y Fiebre Aftosa en vaquillonas Holando naturalmente infectadas con BLV. Para el caso de la inmunización contra *Clostridiumperfringens* se realizó un seguimiento de un grupo de animales BLV positivos (n=29) y otro grupo libre de la infección (n=19), en cambio para la Fiebre Aftosa se trabajó con un grupo de animales BLV negativos n=20, BLV positivo n=10 y un tercer grupo n=5 que luego seroconvierten a lo largo del estudio (SC), todos los grupos se mantuvieron durante doce meses en un campo de cría de Florida, Uruguay. Los animales recibieron tres dosis de una vacuna contra Clostridios (días 0, 30, 150), se extrajó muestras de sangre los días 0, 30, 60, 90, 180 y 365 posvacunación. Para el caso de Fiebre Aftosa la cual es una enfermedad infectocontagiosa bajo campaña sanitaria obligatoria en Uruguay, la vacunación fue realizada según legislación vigente de ese año en el mes de mayo. Se realizó la toma de muestras el día 0, 15, 60, 165 y 300 días posvacunación (dpv). Se utilizó la técnica de ELISA para analizar la respuesta inmune humoral y cuantificar anticuerpos totales contra las toxinas alfa, beta y épsilon del *Cl. perfringens* y seroneutralización *in vitro* para la toxina épsilon, como también medir los anticuerpos totales anti-A24 / Cruzeiro, títulos de IgM, IgG1, IgG2 e índice de avidéz de anticuerpos específicos para Fiebre Aftosa. Los resultados evidenciaron una baja respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon utilizando la técnica de referencia disponible, mientras que la respuesta de anticuerpos totales utilizando ELISAs comerciales fue variable según la toxina y no se correlacionó con la seroneutralización *in vitro*. No se evidenciaron diferencias significativas en la respuesta inmune ante la vacunación contra *Clostridiumperfringens* entre animales seropositivos y seronegativos utilizando las técnicas mencionadas. En el caso de Fiebre Aftosa, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en términos de anticuerpos totales, hubo una diferencia significativa a los 15 días posvacunación entre los grupos BLV negativos y BLV positivos con respecto a los títulos de IgM e IgG1, siendo más altos en los animales libres de BLV. Los animales que se reconvirtieron durante el estudio (SC) no mostraron diferencias con el grupo BLV negativo. Nuestros datos sugieren que dependiendo del tipo de inmunización que se aplica al ganado, la respuesta inmune de un animal seropositivo a BLV puede comportarse diferente al animal seronegativo.

2. SUMMARY

Enzootic Bovine Leukosis is the main virus that affects dairy cattle in Uruguay. Subclinical infection causes important dysfunctions of the immune system which has a direct impact on animal health. The objective of this study was to investigate the impact of bovine leukosis virus (BLV) infection against field immunizations against *Clostridium perfringens* and Foot-and-Mouth Disease in Holando heifers naturally infected with BLV. In the case of immunization against *Clostridium perfringens*, a group of BLV-positive animals (n = 29) and another group free of infection (n = 19) were followed. In contrast, Foot and Mouth Disease was treated with a group of BLV negative animals n = 20, BLV positive n = 10 and a third group n = 5 that later seroconvert throughout the study (SC), all the groups were kept for twelve months in a rearing field in Florida, Uruguay. The animals received three doses of a vaccine against *Clostridium* (days 0, 30, 150). Blood samples were taken on days 0, 30, 60, 90, 180 and 365 post-vaccination. In the case of foot-and-mouth disease, which is an infectious disease, under a mandatory health campaign in Uruguay, the vaccination was carried out according to the current legislation of that year in the month of May. Samples were taken on day 0, 15, 60, 165 and 300 days post vaccination (dpv). The ELISA technique was used to analyze the humoral immune response and quantify total antibodies against the alpha, beta and epsilon toxins of *Cl. Perfringens* and in vitro seroneutralization for the epsilon toxin, as well as to measure the total anti-A24 / Cruzeiro antibodies, IgM, IgG1, IgG2 titers and avidity index of antibodies specific for Foot-and-Mouth Disease. The results showed a low neutralizing antibody response against the epsilon toxin using the reference technique available, whereas the response of total antibodies using commercial ELISAs was variable according to the toxin and did not correlate with in vitro seroneutralization. There were no significant differences in the immune response to vaccination against *Clostridium perfringens* between seropositive and seronegative animals using the techniques mentioned. In the case of foot-and-mouth disease, although no significant differences were found between the groups in terms of total antibodies, there was a significant difference at 15 days post vaccination between the BLV negative and BLV positive groups with respect to the IgM and IgG1 titers, which were higher in the BLV-free animals. The animals that were reconverted during the study (SC) did not show differences with the BLV negative group. Our data suggest that depending on the type of immunization that is applied to livestock, the immune response of a seropositive animal to BLV may behave differently than the seronegative animal.

3. INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina (linfoma maligno) es una enfermedad neoplásica maligna del tejido linfocítico, siendo crónica y mortal. Es causada por el virus de la familia *Retroviridae*, llamado Virus de la Leucosis bovina (BLV) (Lüchter, 2004). El 90% de los animales infectados son asintomáticos (60% asintomáticos y 30% linfocitosis persistente) (Bartlett y col., 2013). El BLV se transmite por vía horizontal y vertical, siendo la primera la vía responsable de la mayoría de las infecciones (Hopkins y col., 1997), pudiendo jugar un papel crítico en la transmisión y el contacto directo entre animales infectados (Gutiérrez y col., 2011). La transmisión se da por el traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano y estos linfocitos se pueden encontrar en las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen, orina y heces, siendo fuentes potenciales de contagio; siendo la gran fuente de infección en los rodeos los animales portadores asintomáticos (de la Sota, 2005; Hopkins y col., 1997). Los estudios serológicos revelan que la infección por el BLV se disemina ampliamente por todo el mundo, con altas tasas de prevalencia en América del Norte, América del Sur, África, Asia y Australia (Hopkins y col., 1997). Las prácticas de manejo, que tienden a diferir sustancialmente entre la producción de carne y productos lácteos y dentro de rebaños y lecherías individuales, son factores importantes en la transmisión de BLV (Hopkins y col., 1997). Un aumento notorio del comercio que hubo en la última década en el cual se hacía una selección de vaquillonas libres de BLV para exportación por ser una barrera sanitaria, provocó que en el país hubiera un aumento de la prevalencia de la enfermedad en el rodeo ocasionando pérdidas económicas directas e indirectas (Furtado y col., 2013; MERCOSUR, 1996). La infección por BLV puede afectar el sistema inmune innato, adaptativo y las células no infectadas (Blagitz y col., 2017). El BLV altera los niveles circulantes de citoquinas y la producción de las mismas en respuesta a estímulos; las citoquinas tienen funciones como el crecimiento, la polarización y la capacidad de respuesta de diversos tipos de células inmunitarias y la regulación de la fuerza y la duración de las respuestas inmunes (Frie y col., 2015).

Las enfermedades clostridiales son toxi-infecciones, producidas por bacterias del género *Clostridium* (*Cl*) (Robles, 1998). Los *Clostridium* spp. son bacterias anaerobias, Gram positivas, esporuladas, toxigénicas, telúricas, habitantes normales del intestino de todas las especies animales (Lüchter, 2004), se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden perdurar años en el suelo y el ambiente. Las estrategias de control son en base a lograr tener una buena inmunidad en los momentos de mayor riesgos y un manejo preventivo como por ejemplo desinfectar las heridas e higienizar el instrumental e instalaciones, evitar generar heridas y los cambios bruscos de alimentación (Robles, 1998).

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, vírica, aguda, febril, que afecta animales biungulados (bovinos, ovinos, caprinos, suinos, etc). El agente causal de la FA es el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), un *Picornaviridae* del género *Aphthovirus* (Lüchter, 2004). La enfermedad se propaga por contacto directo entre animales infectados y los sanos susceptibles (Balakrishnan, 2015). La Fiebre Aftosa a nivel mundial tiene muchos gastos en prevención y daños agrícolas como también pérdidas económicas por restricciones comerciales. Los más afectados son los países pobres que no pueden cubrir los gastos teniendo brotes incontrolados y siendo fuentes de contagio (Smith y col., 2014). El control de la fiebre aftosa en áreas endémicas se implementa mediante diagnósticos, vigilancia y vacunación masiva regular (Rodríguez y col., 2009; Díaz y col., 2017). El plan sanitario Nacional de prevención contra la enfermedad consta de vacunar todo el rodeo en

febrero, en mayo los bovinos menores de dos años y en noviembre los terneros nacidos en el año (actualmente ésta última instancia se encuentra suspendida). Las vacunas utilizadas en Uruguay son bivalentes, conteniendo los antígenos “A24” y “O1” inactivados, con adyuvante oleoso. En el país es una enfermedad de notificación (denuncia) obligatoria (MGAP, 2013).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto del BLV sobre la respuesta inmune humoral contra clostridiosis y Fiebre Aftosa, ya que el BLV puede afectar la regularización del sistema inmune y las enfermedades clostridiales como la fiebre aftosa se previenen mediante la inmunización. Ambas enfermedades poseen características epidemiológicas y sintomáticas importantes, que siendo mal prevenidas pueden conllevar a grandes pérdidas productivas a nivel nacional e internacional.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

La Leucosis Bovina (linfoma maligno) es una enfermedad neoplásica maligna del tejido linfocítico, siendo crónica y mortal. La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es causada por el virus de la familia *Retroviridae*, llamado Virus de la Leucosis bovina (BLV) el cual produce una infección crónica y persistente que afecta principalmente a los linfocitos B. Este proceso puede más tarde culminar con la formación de linfosarcomas multicéntricos (6-8 años luego de la infección). El BLV es de importancia mundial por su gran distribución e incidencia, con una considerable transmisión del agente causal a partir de los animales infectados subclínicos (Lüchter, 2004). El 90% de los animales infectados son asintomáticos (60% aleucémicos y 30% linfocitosis persistente), produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones importantes en el sistema inmune (Bartlett y col., 2013).

La aparición por primera vez en el ganado de LBE fue reportada por Leisering, quien describió la presencia de nódulos amarillentos en el bazo agrandado/inflamado de una vaca en el año 1871 (Gillet y col., 2007).

4.1.1. Descripción del agente

El agente causal de la LBE es un virus, el BLV denominado en inglés como *Bovine leukemia virus*, perteneciente al orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Deltaretrovirus* (ICTV, 2018).

Dentro de la familia *Retroviridae* encontramos el BLV, los virus T-linfotrópico humano tipo 1 y 2 (HTLV-1 y HTLV-2) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV 1, 2 y 3) los cuales están relacionados desde el punto de vista estructural y funcional, pero manteniendo una marcada diversificación genética con los mismos, explicado por el tipo de célula blanco que cada uno infecta (Fischer, 2012; OIE, 2018).

La partícula de BLV tiene un tamaño de entre 80 y 120 nm de diámetro, es esférica y presenta una envoltura lipídica (Moratorio, 2012), esta bicapa lipídica de origen celular interviene en el reconocimiento, absorción y penetración en su célula blanco (linfocito B) en conjunto con el complejo de proteínas virales insertadas en ella, como la glicoproteína de superficie SU (gp51) y la glicoproteína transmembrana TM (gp30) (Fischer, 2012).

Como ya se mencionó el genoma del BLV está compuesto de dos copias idénticas de ácido ribonucleico (ARN), de cadena simple y polaridad positiva, unidas en forma no covalente por el extremo 5', formando un dímero. El empaquetamiento del material genético con las proteínas virales para formar la partícula viral es un proceso complejo, que involucra como primer evento la unión de zonas específicas del ARN genómico con la proteína mayoritaria de cápside p24 (CA). Esta proteína mantiene en interacción al ARN viral con proteínas de la nucleocápside p12 (NC) y la proteína de matriz p15 (MA) que interconecta la cápsula con la envoltura externa. La partícula viral termina de formarse durante su extrusión de la célula, cuando el virión adquiere la envoltura mediante el proceso de exocitosis (Gillet y col., 2007; Gutierrez, 2010).

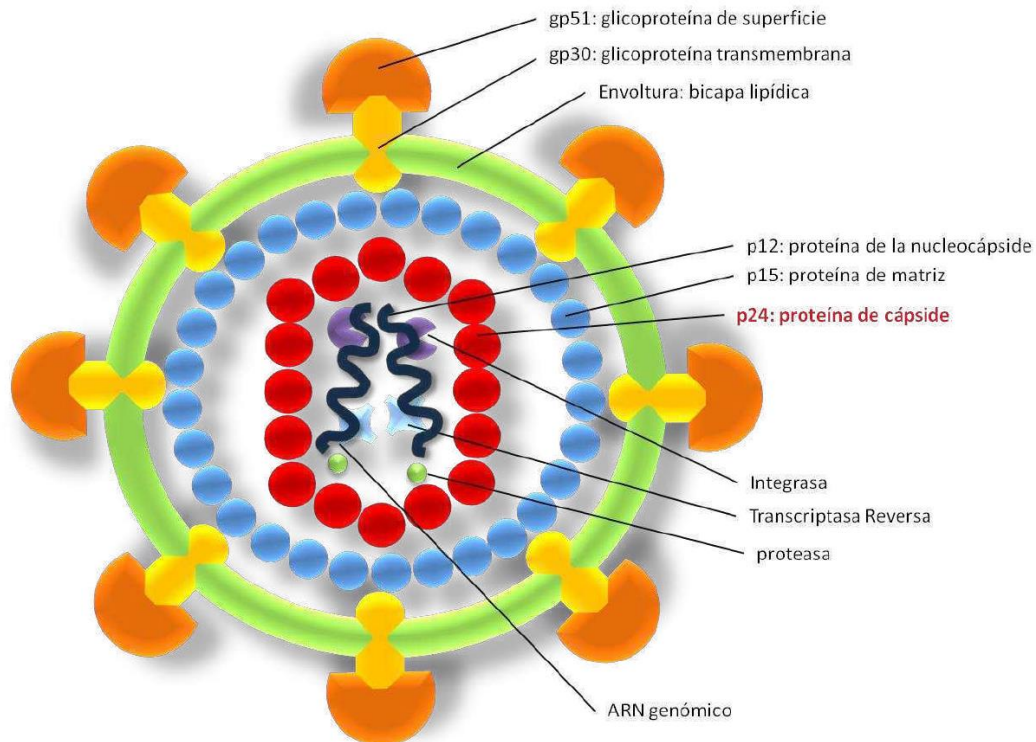


Fig. 1. Esquema de una partícula de BLV. Adaptado de Science, 1988, 240 1427-1434 (Gutiérrez, 2010).

Además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* requeridos para la síntesis de la partícula viral, el genoma del BLV contiene una región X localizada entre la envoltura y la repetición terminal larga de 3' (Gillet y col., 2007). Gracias a una región genómica entre el *genenv* y el LTR3' los virus deltaretrovirus son capaces de regular su propia expresión genética por la síntesis de proteínas reguladoras expresadas por su genoma (Moratorio, 2012).

Al ser un retrovirus ARN, necesita para su replicación una enzima denominada transcriptasa reversa que convierte su genoma ARN hebra simple a un intermediario de ADN doble hebra. Este ADN del provirus es el que se integra al azar mediante enlaces covalentes en el ADN de la célula hospedadora, uniendo los genomas y persistiendo en forma latente sin producción constante de progenie vírica (Fischer, 2012; Moratorio, 2012; Obal, 2014; OIE, 2018). Para la transcripción reversa y la integración del genoma viral se necesita dos proteínas enzimáticas, la transcriptasa inversa (RT) y la integrasa (IN) respectivamente, que están dentro de la cápsula (Gillet y col., 2007).

Existen autores que afirman que la variabilidad genética (mutación y recombinación) del BLV es baja debido a la latencia en el genoma del hospedero en conjunto con el uso de la mitosis celular como principal vía de replicación de su genoma (Fischer, 2012), otros autores aseguran que existe mayor variabilidad genética de la que se pensaba, un estudio reveló que en América del Sur se encontraron siete genotipos de BLV que circulan en la región, siendo el genotipo 1 el que está presente en Uruguay (Moratorio y col., 2010).

4.1.2. Epidemiología: situación a nivel Mundial, Regional y Nacional

Los estudios serológicos revelan que la infección por el BLV se disemina ampliamente por

todo el mundo, con altas tasas de prevalencia en América del Norte, América del Sur, África, Asia y Australia. Las tasas de infección declaradas son generalmente más altas en América del Norte que en Europa, donde en este último continente, participan muchos países en los programas de erradicación de BLV (Hopkins y col., 1997).

Mundial:

El estudio de Murakami y col. (2013) describe los resultados de un estudio nacional en los años 2009-2011, al respecto de la infección por BLV, el mismo fue llevado a cabo en ganado lechero y en ganado de cría vacuno de Japón. Los resultados indicaron una mayor prevalencia de BLV en el ganado lechero en comparación con la cría de ganado vacuno en Japón. Como también observaron un aumento de las seroprevalencias comparando un estudio de los años 1980-1982, siendo 10 veces más en ganado lechero y 4 veces más en el de carne. Sugiriendo estos datos que el ganado lechero se ve más afectado por la infección a BLV.

Hopkins y col. (1997) también llega a la misma conclusión en su estudio, en la cual el ganado lechero generalmente tiene una mayor prevalencia en comparación con el ganado de carne. Estas observaciones sugieren que las prácticas de manejo, que tienden a diferir sustancialmente entre la producción de carne y producción lechera, como también dentro de los rebaños, son factores importantes en la transmisión de BLV. No se han reportado diferencias significativas de infección según sexo o raza.

En concordancia con lo anterior otro estudio realizado en Manitoba (Canadá) también demostró que hay una mayor prevalencia de animales BLV positivos en vacunos de leche. Obteniendo de un muestreo de 1204 vacas de leche y 1425 de carne una seropositividad del 60,8% y 10,3% respectivamente (VanLeeuwen y col., 2006).

Regional:

Un estudio demostró que, en un establecimiento en la Universidad pública de Lima, Perú, tienen una prevalencia de 95,7% a BLV (Sandoval y col., 2015) y a nivel de Brasil, Costa y col. (2013) encontraron una prevalencia en 23 establecimientos del Estado Espírito Santo de Brasil de un 27,9% demostrando que la enfermedad es endémica en la zona y de un 37% en 881 muestras de bovinos lecheros en el estado de Tocantins (Fernández y col., 2009).

En Argentina la infección con BLV es endémica, la prevalencia se ha incrementado notoriamente en los últimos 20 años antes del 2011, demostrando ser la LBE un problema sanitario importante. Gutiérrez y col. (2011) encontraron que la prevalencia en el rebaño de estudio durante tres años con procedimientos estrictos de manejo para evitar o minimizar el contacto con sangre infectada vía iatrogénica fue alta. Obtuvieron una seroprevalencia final del 95,1% a BLV (seroprevalencia de 11,47% en animales recién nacidos, luego 15% a los 15 meses y 24% a los 27 meses, hasta un 40% y 60% a los 30 y 36 meses, respectivamente). Indicando que a pesar de las medidas tomadas de manejo no hubo cambios significativos en la prevalencia de BLV. Otro estudio realizado en la provincia de Corrientes da como resultado una prevalencia de rodeo de un 66% (Jacobo y col., 2007).

Nacional:

Uruguay es un país mayoritariamente agropecuario, donde se diferencia actualmente un sector pecuario de menor dinamismo y un sector agrícola muy dinámico, que se convierte en el gran responsable de una importante transformación en la economía del país en los últimos años. A consecuencia de la competencia por recursos debido al desarrollo extraordinario de la agricultura y en especial de la soja, es que la producción pecuaria fue obligada a modernizarse e intensificar el uso de la tierra, el sector lechero sufrió una relevante pérdida de hectáreas pudiendo compensarla con un incremento de la productividad (OPYPA-MGAP, 2015).

Es considerado un importante país exportador de productos lácteos, especialmente de leche en polvo y quesos, siendo destinada a la producción lechera unas 827 mil hectáreas del territorio uruguayo. En el año 2017 se contabilizó que existen 3718 establecimientos especializados, teniendo una producción de leche comercial de 2.049 millones de litros, remitiendo a planta y venta directa unos 1.748 millones de litros (MGAP-DIEA, 2018). También otro rubro en creciente auge es la exportación de bovinos en pie, en el 2014 hay informes puntuales de que Uruguay exportó 33.757 vacunos en pie hacia China de los cuales 29.557 fueron terneras Holando, en 2015 se informa un embarque de 4.000 terneras Holando de entre 8 y 15 meses (El País, 2015) y en agosto del 2017 a través de otro embarque se exportó al mismo país 507 vaquillonas Holando, de las cuales 370 iban preñadas y el resto vacías (El País, 2017).

En el 2017 se exportó un total de 299.593 cabezas de ganado en pie, siendo la mayoría ganado de carne y otra parte vaquillonas Holando (MGAP-DIEA, 2018). Aunque hoy en día hay una gran disminución de la exportación de vaquillonas Holando a China, ya que Australia compete con mejores precios por cabeza y flete, haciendo que Uruguay pase del primer lugar al cuarto como proveedor (El País, 2018), ese aumento notorio de comercio que hubo en la última década en el cual se hacía una selección de vaquillonas libres de BLV para exportación por ser una barrera sanitaria, provocó que en el país hubiera un aumento de la prevalencia de la enfermedad en el rodeo, ocasionando pérdidas económicas directas e indirectas (Furtado y col., 2013; MERCOSUR, 1996). A pesar de que no hay estudios realizados que hayan medido la prevalencia general de la enfermedad a nivel país, se sabe que es una enfermedad altamente difundida con prevalencias que van desde el 11% al 77% según la zona estudiada (De Brun y col., 2014).

Mederos y col. (1998), realizaron un relevamiento epidemiológico de LBE en el territorio nacional, donde se analizaron 400 vacas en producción de los rodeos lecheros del noreste del país (departamentos de Cerro Largo, Rivera, Tacuarembó y Artigas). Teniendo como resultado que un 77% de los predios estudiados presentaban algún animal con serología positiva a BLV y la prevalencia era del 20,25%. Para el año 2001 se realizó un estudio en donde se visitaron 53 establecimientos de Florida y se analizaron 1060 vacas en ordeño obteniendo una prevalencia de 46,62%, indicando que en la mayoría de los establecimientos la infección se localizaba entre un 26% a 50% en el rodeo (Guarino, 2001).

Collazo y col. (2002) realizaron otro relevamiento en 4 establecimientos de la cuenca lechera de Salto durante 1997 y 2000, teniendo un 45% de animales positivos con presencia de anticuerpos por ELISA. Luego, Zaffaroni y col. (2007) determinaron los valores de prevalencia para BLV en la cuenca lechera Sur de Uruguay, que comprende los departamentos de Colonia, Florida y San José. Resultando en una prevalencia de 73% para la población estudiada en general y un 75% en especial para el departamento de Florida, éste estudio comparativo con otro de 1998 demostró que la enfermedad viene en creciente aumento en nuestro país.

Furtado y col. (2013), encontraron una seroprevalencia real contra BLV del 14,5% en animales adultos de pequeños productores lecheros de la cuenca Centro-Sur del país (Durazno, Florida y Tacuarembó), medido por inmunodifusión en gel agar (IDGA). En otro estudio realizado en un campo de recría de ganado lechero en el Sur de Uruguay, se encontró una prevalencia alta en animales jóvenes (8 meses aproximadamente) al ingreso del establecimiento con un porcentaje de seropositivos de 45%. Siendo un valor alto para esa categoría, la explicación posible a tal porcentaje es la selección positiva a LBE a nivel Nacional por la creciente exportación de ganado bovino seronegativo al exterior. Obtuvieron una tasa de seroconversión durante 12 meses de 39,8% y una seroprevalencia luego de 18 meses de 73.5% (De Brun y col., 2014).

Tanto los estudios a nivel regional como nacional coinciden en que la prevalencia aumenta con la edad y que las tasas pico de infección tienden a ocurrir en el intervalo en el que las vaquillonas están siendo criadas, paridas e ingresadas al rodeo de ordeño. Una época de intensa intervención humana y exposición a ganado adulto con mayores tasas de BLV (Hopkins y col., 1997).

4.1.3 Formas de transmisión del agente

El BLV se transmite por vía horizontal y vertical, siendo la primera la vía responsable de la mayoría de las infecciones (Hopkins y col., 1997), pudiendo jugar un papel crítico en la transmisión el contacto directo entre animales infectados (Gutiérrez y col., 2011).

La transmisión se da por el traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano, estos linfocitos se pueden encontrar en las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen, orina y heces, constituyendo fuentes potenciales de contagio; siendo una gran causa de infección en los rodeos los animales portadores asintomáticos (de la Sota, 2005; Hopkins y col., 1997).

El ganado que se encuentra en rebaños con alta prevalencia de BLV o antecedentes de linfosarcomatiende a adquirir la infección por BLV a una edad más temprana. La alta prevalencia de BLV en los rebaños se asocia con altas tasas de linfocitosis persistente (PL) y linfosarcoma. Las vacas linfocitóticas no solo tienen recuentos de linfocitos absolutos más altos, sino que del 25% al 35% de los linfocitos circulantes tienen ADN de BLV proviral integrado, en comparación con aproximadamente el 5% de las vacas infectadas sin PL. Por lo tanto, los volúmenes sanguíneos más pequeños de las vacas PL (50 nL) pueden ser suficientes para inducir la infección por BLV (Hopkins y col., 1997). También se ha demostrado que existe una correlación entre la carga proviral de sangre periférica y la carga proviral de calostro/leche. Los animales con baja carga proviral presentan un menor riesgo de transmisión de la infección (Gutiérrez y col., 2011).

La infectividad del BLV dependerá del recuento de linfocitos infectados en el fluido (Straub, 1982), el cual puede aumentar si ocurre un proceso exudativo (Hopkins y col., 1997). La mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo tanto, cualquier medida de manejo o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, descorne, aplicación de inyectables, palpación rectal que se practiquen sin tomar medidas profilácticas correspondientes, son una importante forma de transmisión de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerickx y col., 1987; Hopkins y col., 1997). En cuanto a la palpación rectal

sin cambio de guante es considerada un factor de riesgo para el ganado, es posible que la sangre del tracto reproductivo de vacas persistentemente infectadas altamente infecciosas cause contaminación suficiente del guante durante el procedimiento pudiendo diseminar la infección (Divers y col., 1995).

Pero el ciclo de transmisión BLV no se puede romper eficientemente sólo con una intervención basada en la prevención del contacto iatrogénico con la sangre, ya que otras formas de transmisión desempeñan un papel clave en condiciones naturales (Gutiérrez y col., 2011). Dentro de esas otras vías encontramos la transmisión horizontal por vectores vivos como los tábanos y las moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*) (De Brun y col., 2014), en las moscas de los cuernos se pudo comprobar mediante estudio la presencia del provirus de BLV (García y col., 2016).

En el caso de la vía vertical se sabe que existe un gran contenido de virus de LBE en el calostro y que las infecciones en la recria por ingestión de calostro o leche no son extrañas. Pero el desencadenamiento de la enfermedad a través de este es inusual ya que existe competencia con los anticuerpos maternos transmitidos en ese calostro. El contagio prenatal se evidencia por los porcentajes de nacidos serológicamente positivos, que van del 3 al 20% (de la Sota, 2005).

Comparando la oportunidad de contagio entre diferentes sistemas productivos, Santos y col. (2013) llegan a la conclusión que los animales criados en sistemas intensivos tienen 19,1 chances más de infectarse que uno que está en un sistema extensivo. En concordancia con lo anterior De Bun y col. (2014) demuestran que no sólo la vía de transmisión es importante sino también el lugar y las condiciones de hacinamiento y manejo dónde están los animales. Los cuales juegan un papel importantísimo en la propagación de la enfermedad, llegando a la conclusión de que los campos de recria podrían facilitar la misma.

4.1.4. Patogenia y manifestaciones clínicas

En primera instancia el BLV infecta los linfocitos B que expresan IgM de un individuo susceptible mediante células infectadas que contienen el genoma viral, esto se da a través de las vías de transmisión ya mencionadas en el punto 4.1.3. Luego ocurre una expansión policlonal de linfocitos B portadores de uno a cinco provirus integrados (Gillet y col., 2007). Esa expansión no maligna del compartimento de células B se denomina linfocitosis persistente (PL) (Kabeya y col., 2001). Aparte del tropismo del BLV por células B también lo presenta por las células TCD8+, monocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMNL), las cuales portan el provirus (de Souza y col., 2012).

Durante el primer mes post infección las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos (Fulton y col., 2006).

Las vacas infectadas por BLV con linfocitosis persistente tienen mayor recuento de leucocitos por el aumento de número absoluto de linfocitos. Hay aumento de linfocitos B (CD21+), donde se alberga la mayor carga proviral, y también células CD5+ y CD11b. El aumento de linfocitos B circulantes se correlaciona con el aumento de células T y linfocitos TCD8+ en bovinos con LP (Libera y col., 2012).

En los bovinos existen tres fases descritas por de la Sota (2005) para la enfermedad, donde la primera y segunda etapa no presentan manifestaciones clínicas. La primera es inaparente, hay presencia de anticuerpos humorales contra los antígenos estructurales del BLV y los linfocitos tienen un persistente contenido de provirus. En la segunda etapa existen alteraciones hematológicas en forma de linfocitosis persistente, éste es el caso del 30% a 70% de los bovinos infectados entre 3 a 6 años. En la tercer etapa se presenta la enfermedad tumoral, la misma se da en el 30% de los infectados con LP y en una parte de los que no tienen LP.

La infección por BLV produce una prolongación del período sintomático con una baja carga viral que persiste durante 1 a 8 años. De ese 30% de los animales infectados que progresa a LP solo el 0,1 al 10% desarrollan linfosarcoma maligno (Kabeya y col., 2001).

Se estima que menos de un 5% del ganado lechero infectado desarrollan síntomas clínicos y que tiene un largo período de incubación. Muchos animales que desarrollan síntomas clínicos son enviados a mataderos no pudiendo contabilizar el verdadero porcentaje de animales con sintomatología (Tsutsui y col., 2016).

“Los síntomas dependen del lugar en que aparecen los tumores y pueden incluir desarreglos digestivos, falta de apetito, pérdida de peso, debilidad o decaimiento general y, a veces, signos neurológicos. Los ganglios linfáticos superficiales pueden estar claramente aumentados de tamaño y palpase bajo la piel y mediante un examen rectal” (OIE, 2018). El BLV interfiere en la producción de leche y en la esperanza de vida, si bien no está claro el cómo, una hipótesis es que el BLV causa desregulación inmune, que podría poner al ganado seropositivo en un mayor riesgo de contraer otras infecciones (Frie y col., 2017).

“A la necropsia, los ganglios linfáticos y gran variedad de tejidos están infiltrados por células neoplásicas. Los órganos implicados con más frecuencia son el abomaso, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, el omaso, los pulmones y el útero. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizás también el desarrollo del propio tumor” (OIE, 2018).

Un estudio demostró que la LBE se puede desarrollar en terneros a edad temprana y que un título bajo de anticuerpos no descarta la infección, ya que el ternero al principio tiene una respuesta inmunitaria más débil que los adultos y su capacidad de producción de anticuerpos es relativamente inadecuada (Oguma y col., 2017).

4.1.5. Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la enfermedad con presencia de tumores se puede realizar mediante examen clínico, biopsia y/o necropsia, pero en aquellos animales asintomáticos o que presentan linfocitosis persistente se requieren pruebas de laboratorio para realizar la confirmación (De Brun y col., 2014).

Existen diversas pruebas de diagnóstico directo o indirecto para la LBE, con la utilización de muestras de secreción láctea como el suero bovino, pruebas individuales o colectivas. La O.I.E. (Organización Internacional de Epizootias) nombra diferentes técnicas para la identificación del agente (genoma viral) y para pruebas serológicas (detección de anticuerpos circulantes). De la primera se encuentran el cultivo *in vitro* de células mononucleares de

sangre periférica (PBMC), las pruebas de detección del antígeno como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía electrónica. En las segundas se encuentran la inmunodifusión en gel agar (IDGA) para la detección de anticuerpos en suero, el enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la detección en suero y en muestras de leche (OIE, 2018).

Un estudio comparó las pruebas de IDGA, ELISA y PCR, siendo el IDGA el método que detectó menos animales positivos y la PCR el método más sensible. Siendo la PCR un método de detección más efectivo, ya que detecta el provirus en animales serológicamente negativos por inmunotolerancia, infecciones recientes que no hayan desarrollado respuesta inmunológica (virus latente, animal con baja carga proviral o ternero jóvenes que consumieron calostro de madres positivas), casos de tumor para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso. El PCR sería un buen método complementario para cuando tenemos animales serológicamente negativos por IDGA y positivos a ADN viral, levemente positivos o negativos mediante la prueba de ELISA. Falsos negativos por ejemplo se puede dar cuando hay descenso fisiológico de anticuerpos en el periparto dando resultados falsos negativos desde el día -20 a +60 (Rama G., 2009; OIE, 2018).

La infección del ganado por el virus dura toda la vida y desencadena una respuesta persistente de anticuerpos, detectados por primera vez a las 3–16 semanas post-infección. Los anticuerpos derivados de la madre pueden tardar en desaparecer de 6 a 7 meses, no hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa. Sin embargo, la infección activa se puede confirmar mediante la detección del provirus del BLV mediante la PCR. Los anticuerpos pasivos tienden a proteger a los terneros contra la infección. Una vez infectado el animal, no se detecta viremia, pero sí una fuerte y persistente respuesta inmunológica a las glicoproteínas estructurales, sobre todo a la gp51 de la envoltura y a la proteína principal del núcleo, la p24. La mayor parte de las pruebas rutinarias IDGA y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana (OIE, 2018; González y col., 1999).

Dentro de las pruebas de detección en muestras de leche se puede utilizar PCR o ELISA. En el estudio de Felmer y col. (2006) se describe una forma de diagnosticar la enfermedad y tipificar el virus en muestras de leche mediante la prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. A pesar de que en la leche hay menor cantidad de linfocitos B y que sus niveles como los de las células somáticas varían según el período de lactancia y el estado clínico de la mama (sana o mastítica), la prueba permitió confirmar la presencia del virus en la muestra de leche en tanques prediales con una correlación de 100% entre ELISA y PCR. Otro estudio afirmando lo anterior, de Biéneres (2012), indica que el diagnóstico de LBE no es interferido por la etapa de lactación, cantidad de producción, componentes y estado sanitario de la glándula mamaria (células somáticas), no existiendo diferencia con la prueba de ELISA en suero bovino y el ELISA en la muestra de leche.

Los viriones de BLV o proteínas virales no pueden detectarse directamente en la sangre periférica mediante ninguna técnica disponible (ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación o transferencia de Western). Los transcritos virales de linfocitos o tumores de sangre periférica sólo se pueden amplificar mediante técnicas de RT-PCR muy sensibles, aproximadamente un linfocito B de cada 10.000 expresa el ARNm de tax/rex durante la linfocitosis persistente. Sólo 1 en 50.000 células en la sangre periférica contienen

suficientes transcritos de BLV para identificarse fácilmente. Estas observaciones sugieren que el virus está latente en la gran mayoría de las células detectables (Florins y col., 2007).

4.1.6. Tratamiento, control y prevención de la enfermedad

Cualquier medida de manejo o práctica veterinaria en la cual se vea involucrado material biológico con linfocitos infectados y se realice sin tomar las medidas profilácticas correspondientes se convertirá en una importante forma de transmisión de la enfermedad por vía iatrogénica a consecuencia de una mala praxis o negligencia (Mammerickx y col., 1987; Hopkins y col., 1997).

Para un mayor control existen diferentes estrategias como tener buenas prácticas de higiene en el trabajo a través de la desinfección de materiales contaminados como instrumentos quirúrgico, cortantes o agujas, utilización de sustituto lácteo y tratamiento térmico del calostro (De Brun y col., 2014).

Para cuando en el rebaño se comprueba un índice de contagio del 30% al 40% en poblaciones de hembras madres se recomienda la eliminación de los animales serológicamente positivos en los primeros 14 días de su identificación hasta llegar a un rebaño totalmente libre de LBE. Pudiendo combinarse con el método de sustitución de animales testeados serológicamente negativos (de la Sota, 2005).

En caso de idearse una vacuna para prevenir la infección de BLV o la progresión de la enfermedad, la misma debería inducir respuestas de inmunidad mediada por células específicas. Los antígenos proteicos inactivados con adyuvante pueden hacerlo y también pueden activar la respuesta de linfocitos T citotóxicos (Kabeya y col., 2001).

La eliminación de todos los animales serológicamente positivos sería la medida más rápida para erradicar BLV de los rebaños. Pero esta medida afecta seriamente la economía de la granja y puede no ser factible en rebaños fuertemente infectados, requiriendo medidas moderadas, como la eliminación gradual y sistemática de animales infectados, en la primera etapa de los programas de control (Tsutsui y col., 2010).

4.2. CLOSTRIDIOS

Las enfermedades clostridiales son toxi-infecciones, producidas por bacterias del género *Clostridium* (*Cl*). Siendo sus toxinas y no su agente, las causantes de los síntomas clínicos, cambios anatomopatológicos en necropsias, cambios bioquímicos en los fluidos corporales y muerte al final. Las clostridiosis en general son de curso rápido y en forma de brotes (Robles, 1998).

Las clostridiosis más comunes en Uruguay se clasifican en: mionecróticas sépticas: mancha (*Cl. chauvoei*) y gangrena gaseosa (*Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens* y *Cl. sordellii*); infecciosas: hepatitis necrótica infecciosa (*Cl. novyi tipo B*) y enterotoxemia (*Cl. perfringens tipo D*); intoxicaciones neurotrópicas: tétano (*Cl. tetani* y *Cl. botulinum*) (Mederos, 2013; Uzal 2013).

4.2.1 Descripción del agente

Los *Clostridium*spp. son bacterias anaerobias, Gram positivas, esporuladas, toxigénicas, telúricas, habitantes normales del intestino de todas las especies animales, extraordinariamente distribuidas en la naturaleza persistiendo por decenas de años, incrementando su número junto con la densidad de la población animal (Lüchter, 2004).

Al ser bacterias anaerobias necesitan un factor desencadenante que produzcan baja tensión de oxígeno en los tejidos y tener las condiciones adecuadas para activarse, reproducirse y producir la enfermedad (Robles, 1998). *Clostridiumperfringens* tiene la capacidad de formar esporas, que permiten la supervivencia en ambientes hostiles después de la deposición y facilitan la detección prolongada en ambientes acuático (Mueller y col., 2010).

Específicamente, el *Cl. perfringens* puede ser aislado de muestras de suelo y de agua, pudiendo en ciertas ocasiones comportarse como un patógeno oportunista (Morris y col., 2009). Los sedimentos de agua dulce y los aportes de agua residuales son reservorios de esporas de *Cl. perfringens* portadoras de enterotoxina, siendo la spora una bacteria fecal indicadora (FIB) reflejando la contaminación a largo plazo de una cuenca hidrográfica (Mueller y col., 2010).

Los alimentos con proteínas crudas de origen animal a menudo se pueden contaminar durante el proceso de sacrificio con *Cl. perfringens* procedentes del tracto intestinal o de las heces de los animales. La infección del tracto intestinal por *Cl. perfringens* a través de la vía oral se ve disminuida por un pH gástrico bajo que se mantiene mediante la excreción de ácido clorhídrico por células parietales (Allaart y col., 2013).

En la producción ganadera es de gran importancia por ser el agente causal de enfermedades como la gangrena gaseosa, carbunco sintomático, la enterotoxemia del ovino y del caprino, y la disentería del cordero, entre otras. En la actualidad, la toxinotipificación es el método más difundido de clasificación de estos bacilos. Este método tipifica al *Cl.perfringens* en cinco tipos (A, B, C, D y E) según la producción de las toxinas alfa, beta, épsilon e iota (Morris y col., 2009). Cualquiera de éstas 5 cepas, de la A a la E, pueden infectar heridas en cualquier especie; cada uno con su espectro único de toxinas. El *Clostridium* tipo A forma la toxina alfa, el *Clostridium* tipo B forma la toxina alfa, beta y épsilon, el *Clostridium* tipo C forma las toxinas alfa y beta, el *Clostridium* tipo D forma la toxina alfa y épsilon, el *Clostridium* tipo E forma las toxinas alfa e iota (Iowa StateUniversity, 2004).

4.2.2. Epidemiología

Las enfermedades clostridiales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden perdurar años en el suelo y el ambiente (Robles, 1998). Las heces de animales y humanos infectados son probablemente la fuente más importante de infección de *Cl. perfringens*, aunque también se ha aislado del polvo, aire, superficies estáticas y otros objetos que pueden servir como fomites para la contaminación cruzada (Allaart y col., 2013).

Las enfermedades clostridiales diagnosticadas en Uruguay de mayor frecuencia fueron: *Clostridiumchauvoei* (mancha y gangrena gaseosa), *Clostridiumperfringens* tipo D (enterotoxemias) y *Clostridiumtetani* (tétanos). Y el primer diagnóstico de *Clostridiumperfringens* en Uruguay, donde se aisló e identificó el agente, fue en 1961 por el Dr. Casas Olascoaga siendo el primero el tipo D. Luego en el año 2013 los Dres. Cattáneo, Dutra y Bermúdez aislaron los *Cl. perfringens* tipo A, B y C (Bermúdez y col., 2013).

Los tipos más importantes de *Cl. perfringens* en la medicina veterinaria son el C y D, ya que afectan a la mayoría de los animales de granja, siendo el bovino susceptible a las toxinas del agente (Moreira y col., 2016).

4.2.3. Diagnóstico, Control y Prevención

El diagnóstico definitivo es difícil de realizar ya que después de la muerte del animal estas bacterias invaden los tejidos, enmascarando o incluso imposibilitando conocer el origen del problema, por lo cual la toma y envío de muestras al laboratorio son críticos para poder llegar a un diagnóstico correcto (César, 2010), a su vez la sintomatología de las diferentes clostridiosis son parecidas y los animales entran en putrefacción rápidamente. El aislamiento del clostridios muchas veces no nos confirma el diagnóstico, sino que hay que detectar la toxina también (Robles, 1998).

Las estrategias de control son en base a lograr tener una buena inmunidad en los momentos de mayor riesgos y un manejo preventivo como por ejemplo desinfectar las heridas e higienizar el instrumental e instalaciones, evitar generar heridas y los cambios bruscos de alimentación (Robles, 1998). La reducción de la excreción fecal de *Cl. perfringens* por los animales infectados y la prevención de la contaminación fecal del medio ambiente y alimentos ricos en proteínas crudas pueden reducir el riesgo de infección y, por lo tanto, de enfermedad intestinal. La prevención y el tratamiento de las infecciones virales y parasitarias es importante para prevenir la enteritis asociada a *Cl. perfringens*, ya que las infecciones virales y parasitarias pueden aumentar la cantidad de sustrato para el crecimiento y la producción de toxina por *Cl. perfringens* o pueden mejorar la persistencia y absorción de toxinas clostridiales. Para prevenir el crecimiento excesivo de *Cl. perfringens* se puede dar probióticos (bacterias que pueden beneficiar al huésped), ya que pueden disminuir el crecimiento, la colonización y la producción de toxinas por *Cl. perfringens* en el tracto intestinal y, por lo tanto, la aparición de la enfermedad intestinal. Se ha demostrado que los probióticos, los bacteriófagos y la lisozima son útiles en la prevención, aunque se necesitan más estudios *in vivo* en diferentes especies animales. El efecto de los prebióticos en el desarrollo de la enteritis asociada a *Cl. perfringens* sigue sin estar claro (Allaart y col., 2013).

Los brotes una vez iniciados son casi imposibles de frenar, por lo que el enfoque sanitario de esta enfermedad debe apuntar a la prevención (Robles, 1998). La manera de controlar estas afecciones es mediante la vacunación preventiva (César, 2010). Las vacunas comerciales que están actualmente disponibles son polivalentes y están basadas en toxoides (toxinas inactivadas) y bacterinas (Moreira y col., 2016; Rivera 2014).

4.3. FIEBRE AFTOSA

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, vírica, aguda, febril, que afecta a animales biungulados (bovinos, ovinos, caprinos, suinos, etc) (Lüchter, 2004).

En el ganado bovino y porcino, la infección inicial se localiza en áreas del epitelio específico que recubren el tejido linfoide asociado a la mucosa nasofaríngea (ganado) u orofaríngea (cerdo). La infección progresa rápidamente y el virus se vuelve sistémico, con una eliminación en las secreciones orales y nasales, seguido de la aparición de lesiones vesiculares

típicas en la boca, bandas coronarias, hendiduras interdigitales y otras áreas de la piel sin vello, como el hocico y las tetinas. La enfermedad clínica en animales adultos generalmente se resuelve en dos semanas, pero los animales más jóvenes pueden morir de miocarditis relacionada con la infección. En los ruminantes, el virus puede persistir de manera subclínica en los tejidos nasofaríngeos, denominándose estado portador (de los Santos y col., 2018).

4.3.1. Descripción del agente

El agente causal de la FA es el virus de la Fiebre Aftosa (VFA), un *Picornaviridae* del género *Aphthovirus*, un virus muy chico (23 nm) y del cual hay siete tipos en el mundo: A, O, C, SAT1, 2 y 3 y Asia 1 (Lüchter, 2004). Son siete serotipos inmunológicamente distintos y múltiples subtipos debido a la alta tasa de mutación del virus. El VFA consiste en un genoma de ARN monocatenario (de una sola hebra), positivo encapsulado en una partícula no envuelta icosaédrica (de los Santos y col., 2018; Díaz y col., 2017).

La enfermedad se propaga por contacto directo entre animales infectados y los sanos susceptibles, se transmite a través de la inhalación de gotitas de aerosol que contienen el virus. También se puede transmitir por ingestión de alimentos y agua contaminadas, inseminación con semen de toros infectados, inoculación de vacunas contaminadas, fomites y el movimiento humano. Todas las secreciones y excreciones como la orina, heces, leche, semen, saliva de los animales infectados también son infecciosas (Balakrishnan, 2015).

El ganado bovino es muy susceptible por vía respiratoria, requiriendo una dosis infecciosa 10.000 veces menor a la que requerirían por vía oral para infectarse (Lüchter, 2004).

4.3.2. Epidemiología

La Fiebre Aftosa fue diagnosticada por primera vez en Uruguay en junio de 1870, por el Dr. Bertrand Duprat, permaneciendo en fase endémica hasta 1990 donde se eliminó el último foco del virus tipo “O” (Días y col., 2014).

Luego en 1996 la OIE reconoce por primera vez a Uruguay como país libre sin vacunación, hasta que en el 2000 se reintroduce el virus tipo “O” de FA, y en el 2001 sucede una segunda reintroducción del virus, pero del tipo “A”. Siendo el último foco en agosto del 2001, con un costo en pérdidas de U\$S 1.926.469 y una mortandad de 27.906 entre bovinos, ovinos y suinos. El riesgo de ocurrencia de FA en Uruguay está condicionado a la reintroducción del agente desde fuentes de infección externas (Días y col., 2014).

En el año 2000, Argentina y Brasil transmitieron tardíamente la información sobre la presencia de FA. Brasil demoró veintitrés días en informar los episodios de Río Grande del Sur y el gobierno de Argentina más de un mes en comunicar los brotes evidenciados en dicho país. En particular, las autoridades sanitarias de la Argentina impidieron que los gobiernos vecinos enviaran a sus técnicos para confirmar *in situ* la información oficial acerca de la ausencia de brotes. En este contexto, sumado a que los controles cruzados entre países fueron débiles la FA aparece en el Uruguay en octubre de 2000, en un poblado del departamento de Artigas, frontera con Brasil, en el extremo norte del país (Rodríguez y col., 2009).

Desde la epidemia del año 2001 se han realizado muestreos seroepidemiológicos periódicos y sistemáticamente con el propósito de garantizar la ausencia de actividad viral en todo el

territorio nacional y verificar los niveles de inmunidad poblacional (Días y col., 2014). Actualmente el estatus sanitario de Uruguay ratificado por la “OIE” desde el 2003 es de “País Libre con vacunación” (MGAP, 2009) lo que su prevención con respecto a las inmunizaciones y controles implica un gasto relevante para el Estado.

4.3.3. Diagnóstico, Control y Prevención

La Fiebre Aftosa a nivel mundial tiene muchos gastos en prevención y daños agrícolas como también pérdidas económicas por restricciones comerciales, los más afectados son los países pobres que no pueden cubrir los gastos teniendo brotes incontrolados y siendo fuentes de contagio. Al ser altamente infecciosa y persistente se convierte en una enfermedad compleja de erradicar (Smith y col., 2014).

El control de la fiebre aftosa en áreas endémicas se implementa mediante diagnósticos, vigilancia y vacunación masiva regular. En los países libres de fiebre aftosa, las políticas de control se han basado en la despoblación de animales infectados y en contacto, junto con restricciones en el movimiento de animales y sus productos. Las vacunas actuales contra la fiebre aftosa consisten en un antígeno purificado inactivado por BEI (etilenimina binaria) en formulación con varios adyuvantes, comúnmente contienen más de un serotipo de virus (Rodríguez y col., 2009; Díaz y col., 2017). Los adyuvantes seleccionados son para aumentar la inmunogenicidad y extender la duración de la protección de la vacuna, está el aceite mineral o los adyuvantes acuosos (Díaz y col., 2017).

Los métodos utilizados para controlar los brotes de fiebre aftosa y eliminar la enfermedad han incluido la inhibición del movimiento de animales y productos animales susceptibles, el sacrificio de animales infectados y susceptibles en contacto, la desinfección y los programas de vacunación con un antígeno de virus completo inactivado. Para tener éxito en las campañas para eliminar la fiebre aftosa en un país previamente libre de enfermedad, una nueva vacuna debe inducir protección en una inoculación y debe contener un marcador para permitir una diferenciación inequívoca entre animales vacunados e infectados (Grubman, 2006), como también las tecnologías y sistemas de vacunas deben evitar las trampas de los virus inactivados y ser lo suficientemente baratos como para ser económicamente viables para los países en desarrollo. Las instalaciones donde se preparan las vacunas tienen grandes requisitos de bioseguridad, porque puede haber riesgo de liberación del virus vivo de las instalaciones o la inactivación insuficiente del virus durante la preparación de la vacuna (Smith y col., 2014).

El plan sanitario Nacional de prevención contra la enfermedad consta de vacunar todo el rodeo en febrero, en mayo los bovino menores de dos años y en noviembre los terneros nacidos en el año (actualmente ésta última instancia se encuentra suspendida). Las vacunas utilizadas son bivalentes, conteniendo los antígenos “A24” y “O1” inactivados, con adyuvante oleoso. En el país es una enfermedad de notificación obligatoria desde 1910 por la Ley 3.606 y la autoridad sanitaria competente para la ejecución de la campaña de control y erradicación de la fiebre aftosa es la Dirección General de los Servicios Veterinarios (DGSG), que forma parte del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), existe en el País un fondo de indemnización para compensar a los productores perjudicados económicamente por las medidas de emergencia (sacrificio de animales, inmovilización de vehículos, pérdida de bienes, etc.). La DGSG planifica y ejecuta las actividades de vigilancia que debe cumplir el país para mantener su estatus de libre de fiebre aftosa. Estas son: a) Notificación de

sospechas. b) Inspección en los predios previo al envío de bovinos a faena. c) Control de movimientos mediante el preembarque del ganado. d) Muestras serológicas en las poblaciones bovinas y ovinas. e) Estudio de la inmunidad adquirida por vacunación. f) Control de todas las importaciones de animales, productos y subproductos y del flujo turístico en pasos de frontera, puertos y aeropuertos (MGAP, 2013).

Debido a la rápida propagación de la fiebre aftosa y las graves consecuencias económicas que pueden surgir de un brote, es esencial un diagnóstico rápido, sensible y específico, y la identificación del serotipo del virus. Un diagnóstico de laboratorio confirmado de cualquier caso sospechoso de fiebre aftosa es una cuestión de urgencia y la determinación del serotipo involucrado en brotes de campo (Díaz y col., 2017).

Específicamente en relación a la bioseguridad se debe limitar la manipulación de virus de FA infeccioso solamente a aquellos laboratorios que cuentan con condiciones de bioseguridad de nivel NBS 4 OIE (OMS, 2010). El Laboratorio Oficial de Uruguay, DILAVE, cuenta con un área con nivel de bioseguridad P2, en la sección de virología a nivel central en Montevideo y dispone de medios para el diagnóstico de enfermedades vesiculares en situación de emergencia. Además, existen 3 subcentros (Paysandú, Treinta y Tres y Tacuarembó), siendo PANAFTOSA el laboratorio de referencia para el país. Las técnicas disponibles para el diagnóstico de enfermedades vesiculares son: ELISA 3ABC/EITB (Kit PANAFTOSA), ELISA 3ABC (Kit PRIONICS), ELISA CFL serotipos 0, A, y C (set PANAFTOSA), ELISA-SI (set PANAFTOSA), RT-PCR, rRT-PCR y aislamiento viral (MGAP, 2013).

4.4. RESPUESTAS INMUNITARIAS

4.4.1. Respuesta inmune a BLV en el hospedador

La infección por BLV puede afectar el sistema inmune innato, adaptativo y las células no infectadas (Blagitz y col., 2017), el virus de la Leucosis genera inmunidad humoral e inmunidad mediada por células, esta última es la que suprime la replicación del virus amainando la progresión de la enfermedad (Kabeya y col., 2001).

La primera indicación de la infección es la aparición de la respuesta inmune humoral dentro de las 8 semanas post inoculación. Los anticuerpos que reconocen epítomos de proteínas estructurales (envoltura gp51 y cápside p24) y reguladoras (*Tax* y *Rex*) se sintetizan a títulos elevados y son líticos para las células productoras del virus. Casi al mismo tiempo de la seroconversión temprana aparecen los linfocitos T citotóxicos (principalmente los linfocitos T gamma y delta) específicos para los epítomos *tax* y *enven* sangre periférica. La infección por BLV también desencadena una respuesta de células T auxiliares CD4 dependiente de virus y una independiente de virus. Estas respuestas persisten y se amplifican durante la vida del animal, indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el virus (Gillet y col., 2007; Florins y col., 2007). Aunque en comparación con un animal sano el que contrae la infección tiene menores niveles de CD4+, CD8+ y T gamma y delta, y mayor proporción de células B de IgM+ (SIgM+) de superficie (Frie y col., 2016).

Una de las principales funciones efectoras del sistema inmune es la producción de citoquinas que tienen funciones como el crecimiento, la polarización y la capacidad de respuesta de diversos tipos de células inmunitarias y la regulación de la fuerza y la duración de las respuestas inmunes. La infección por BLV altera los niveles circulantes de citoquinas y la

producción de estas en respuesta a estímulos (Frie y col., 2015). La red de interleuquina está profundamente desregulada en diferentes etapas de la enfermedad, en particular las IL-2, -4, -6, -10 y -12 (Florins y col., 2007) alterando la protección del animal. A su vez, el ganado bovino infectado con BLV presenta alteraciones en las funciones de los monocitos y neutrófilos, aparte de que hay menor porcentaje de neutrófilos y CD11b, los mismos son más longevos perdiendo vitalidad y funcionalidad (Blagitz y col., 2017).

Los polimorfonucleares, principalmente los neutrófilos, están implicados en la defensa innata del animal contra microorganismo invasores mediante la fagocitosis que genera oxígeno reactivo (ROS) para matar las bacterias fagocitadas, este proceso depende del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. La detección de bacterias se hace a través de receptores de reconocimiento molecular como los receptores Toll-like (TLR), expresados altamente en neutrófilos, que inducen el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa y por lo tanto de ROS intracelular. Existen diferentes tipos de receptores, el receptor TLR4 está dirigido por virus como el HTLV-1, el mismo tiene una proteína, p30, que se dirige a la vía de señalización TLR4 afectando su expresión reduciendo la producción de ROS, esta proteína también suprime la actividad enzimática de la glucógeno sintasa quinasa 3-beta lo que induce a la producción de IL-10 inmunosupresora. La p30 del HTLV-1 se asemeja a la descrita en BLV y la expresión de IL-10 en bovinos infectados se ha encontrado elevada en células mononucleares de sangre periférica (de Souza y col., 2012). Libera y col. (2015) comprobaron que la cantidad de ROS intracelular producida por los neutrófilos de la leche fue menor para las vacas infectadas con BLV, particularmente aquellas con PL, que para las vacas no infectadas.

Un estudio encontró que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas del ganado PL expresan menos ARNm de IL-2, IL-4 e IFN-gamma en comparación con el ganado no infectado, mientras que las PBMC del ganado AL expresan menos IL-4 e IFN-gamma indicando una disminución de la transcripción de citoquinas (Frie y col., 2015), estos desequilibrios pueden contribuir a la progresión de la enfermedad (Kabeya y col., 2001).

La producción de interleuquina 12 (IL-12) por los macrófagos, las citoquinas tipo 1 (IL-2 e IFN-gamma) por las células TCD4+ y la proliferación de células T inducidas por mitógeno pueden estar inhibidas por la prostaglandina E dos (PGE2), inmunosupresora, ya que se comprobó que es un regulador negativo a la respuesta de la inmunidad mediada por células. En bovinos con serología positiva pero sin linfocitosis hay aumento de producción de citoquinas Th1 como IL-2 e IL-12 (fase temprana de la infección), en cambio en bovinos con linfocitosis permanente aumenta la expresión de Th2 como de la IL-10. A su vez la IL-10 fue encontrada en ganado con replicación de BLV, por lo tanto la respuesta Th1 es esencial para prevenir la progresión de la enfermedad, sin embargo la IL-2 (factor de crecimiento de células T) puede promover la proliferación de células B infectadas con BLV, aumenta las expresiones de la proteína viral y los receptores de IL-2 en las células B del ganado con linfocitosis permanente, contribuyendo al desarrollo de la misma. En cambio, se considera que el factor de necrosis tumoral (TNF alfa) está involucrado en la eliminación del BLV, sus expresiones se incrementan en la fase temprana de la infección, contribuye al control de la apoptosis (inducción o supresión), proliferación y leucogénesis del linfocito B. Tiene dos receptores para inducir (RI) o inhibir (RII) la apoptosis de células B, en la fase temprana de la infección las células B infectadas con BLV son eliminadas ya que se expresa más el RI, pero algunos de los bovinos con linfocitosis persistente desarrollan cambios de perfiles de

citoquinas expresando mayor cantidad de RII induciendo la proliferación de linfocitos y el desarrollo de leucemia (Kabeya y col., 2001).

En la infección por el HTLV la presencia de CTLA-4 en las células T CD4+, CD25+ y Foxp3+ se correlacionó positivamente con la progresión de la enfermedad. El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) está asociado con el agotamiento inmune, la progresión de enfermedades crónicas y la disfunción de células T, su función es regular la homeostasis y la tolerancia periférica inmunológica inhibiendo la activación de los linfocitos T. Es una molécula expresada en la superficie de la mayoría de los linfocitos T activados, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, y ha sido identificado como una proteína de membrana que se une a CD80 (B7-1) /CD86 (B7-2) en las células presentadoras de antígeno (APC) (Suzuki y col., 2015; Fernández y col., 2006). Por lo tanto, CTLA-4 participa en los mecanismos implicados en la regulación a la baja de las respuestas inmunes durante la progresión de enfermedades crónicas, así como en la facilitación de la evasión inmune por varios patógenos que causan infecciones crónicas y tumores, y CTLA-4 + CD4 + Foxp3 + células T en el ganado tienen una función inmunosupresora (Suzuki y col., 2015).

Las células infectadas que expresan antígenos virales son eliminadas rápidamente por las respuestas citotóxicas y humorales, pero no destruyen las células en las que la transcripción viral está completamente silenciada. Esto sumado al aumento de los linfocitos circulantes TCD8+ y la inhibición de la apoptosis es esencial para desarrollar una PL (Libera y col., 2012). Estas células donde la expresión viral se desactivó o las células sin antígenos virales quedan en estado latente, son sobrevivientes a la destrucción del sistema inmune. Se pueden aislar y detectar *in vivo* si tienen una gran carga proviral, por eso los bovinos con linfocitosis persistente tienen una mayor carga sanguínea proviral (Blagitz y col., 2017).

Resumiendo, la infección por BLV induce una respuesta inmune humoral y citotóxica muy activa enseguida del comienzo, estas actividades antivirales se amplifican y persisten a lo largo de la vida del animal lo que indica que el sistema inmune es estimulado permanentemente por los antígenos de BLV, por lo tanto, debe producirse cierto grado de expresión del virus *in vivo*. Cabe aclarar que las respuestas citotóxicas y humorales son incapaces de destruir células en las que la transcripción viral está completamente silenciada. (Florins y col., 2007). A su vez varios virus pueden afectar las funciones de los polimorfonucleares implicados en la defensa del huésped predisponiendo al animal a diferentes coinfecciones o superinfecciones, aumentando la gravedad de las infecciones. El BLV se ha asociado con la coinfección de algunos microorganismos, se vio que hubo una tendencia a la disminución en la producción de ROS producida por los PMNL provocado por *E. coli* en animales infectados con BLV (de Souza y col., 2012).

4.5. VACUNACIÓN

En el transcurso de la historia de la humanidad hubo muchas enfermedades infectocontagiosas mortales, el surgimiento de las prácticas de inmunización constituyó uno de los elementos de mayor importancia para la salud de la población. El surgimiento de las prácticas para la inmunización se encuentra relacionado a la viruela (enfermedad viral). La primera técnica empleada fue la variolización, en el siglo X, en China, procedimiento que pretendía establecer un sistema de profilaxis en las personas sanas a partir del contacto con virus vivos procedentes de personas que padecían la enfermedad de forma leve (Veiga y col., 2007; Guerra y col., 2017).

Luego el cirujano inglés Edward Jenner introducía la vacuna como una nueva etapa en la lucha contra la enfermedad, desarrollando una variante en la práctica inoculatoria basada en la observación empírica de que las personas infectadas por viruela de las vacas (cowpox) se hacían refractarias a la viruela humana (smallpox) (Duro y col., 2017).

La vacuna, que había partido en la expedición de Balmis desde la Coruña en 1803, nunca llegó al Río de la Plata, donde la noticia del descubrimiento de Jenner ya había llegado y había generado gran ansiedad. Sin embargo, en julio de 1805, la tan ansiada vacuna llegó al puerto de Montevideo en un barco esclavista: la fragata portuguesa Rosa del río. En ella, iban 38 esclavos negros, de los cuales tres portaban en sus brazos las pústulas vacunales (Guerra y col., 2017). A finales de 1870, Pasteur desarrolló una técnica para atenuar patógenos y logró desarrollar la primera vacuna atenuada frente a la rabia (Cambronero y col., 2017).

El objetivo de las vacunas es prevenir la infección, mediante el inicio de la respuesta innata (primera línea de defensa) y la activación de las células presentadoras de antígenos (CPA) para inducir una respuesta efectiva y a medida para cada patógeno. Esa respuesta innata iniciada debe ser capaz de desencadenar y dirigir la respuesta adaptativa e inducir memoria inmune, proporcionar inmunidad prolongada con el menor número de dosis posible, ser termoestable, fácil de administrar y con buen perfil de seguridad (Cambronero y col., 2017).

Se reconocen dos tipos de inmunización, una inmunización pasiva en la cual la resistencia es temporal e inmediata por medio de la transferencia de anticuerpos de un animal resistente a otro susceptible. El otro tipo es la inmunización activa, consiste en administrar antígeno al animal induciendo una respuesta inmunitaria protectora, logrando con una re-inmunización o exposición a la infección producir una respuesta inmune secundaria, es de duración larga y puede volver a estimularse (Tizard y col., 2009).

Las vacunas clásicas son preparados que incluyen patógenos vivos atenuados o patógenos enteros inactivados (en las que se reduce o elimina, respectivamente, la virulencia del patógeno). Las vacunas vivas atenuadas producen una infección débil y asintomática, generando inmunidad a largo plazo similar a la que se observa en los individuos que han presentado la infección natural. Sin embargo, los altos niveles de reactogenicidad producidos por algunas vacunas de patógenos enteros o la incapacidad de realizar cultivos celulares de algunos patógenos condujeron al desarrollo de vacunas basadas en subunidades o en antígenos purificados o recombinantes (Cambronero y col., 2017).

4.5.1. Inmunización contra Clostridios

La erradicación de las enfermedades causadas por las toxinas de *Clostridium* es casi imposible, la vacunación representa el mejor método para controlar y prevenir estas enfermedades (Moreira y col., 2016; de Faria y col., 2018). Puede haber diferentes presentaciones como vacunas que sean monovalente (un sólo *Clostridium*), polivalente (más de un *Clostridium*) o combinada (por ejemplo, mancha y carbunco bacteridiano) (César, 2010). Las mismas son basadas en toxoides (toxinas inactivadas con formaldehído) y bacterinas (Moreira y col., 2016; Rivera 2014).

Es importante tener en cuenta ante un manejo que implique riesgos de contraer la infección (descole, castración, etc) que la protección post vacunación tiene una demora de 2 semanas y

la duración de la inmunidad es de un año. Existen diferentes planes de vacunación, César (2010) recomienda una primovacuna seguida de dos dosis a los 20-30 días, mientras que Robles (1998) recomienda una primovacuna, seguida de un booster a las 3-6 semanas y luego un refuerzo anual para lograr una buena inmunidad basal y el mantenimiento de esta. A su vez Robles (1998) comprobó a través de una investigación en ovinos que para generar una buena inmunidad es necesario la aplicación de doble dosis de vacuna separadas entre 3-6 semanas, donde un grupo de ovinos que recibió dos dosis de una vacuna anticlostridial generó protección por todo el año y otro grupo que recibió una única dosis produjo una respuesta inmune pobre donde a las 7 semanas había llegado a su punto máximo y luego descendió.

A su vez otro estudio de Rivera (2014) donde bovinos inmunizados con dos dosis espaciada por 42 días de una vacuna polivalente contra *Cl. perfringens* fueron desafiados al agente a 56 días de la primovacuna, se observó que el grupo inmunizado sobrevivió a diferencia del grupo control sin inmunizar que generó la enfermedad, concluyendo que la protección es buena y genera memoria inmunológica. Este mismo estudio da como resultado que la inmunidad humoral generada por la vacunación alcanza valores de *cut off* a los 90 días post vacunación y a los 360 días por debajo del mismo, indicando la necesidad de la revacunación anual y que la misma genera anticuerpos más altos comportándose como booster.

No hay muchos estudios sobre la respuesta inmune de los Clostridios y más aun específicamente de *Cl. perfringens*. Un estudio demostró que la IgG es la principal inmunoglobulina estimulada ante la inoculación de la cepa muerta CH3 de *Cl. chauvoei* capaz de proteger a los ratones de contraer la infección y que el anticuerpo IgM no fue estimulado por el antígeno protector o no fue capaz de otorgar protección pasiva a los ratones. La respuesta IgM es de aparición temprana en el tiempo, pero luego desaparece (Chandler, 1975).

Existen diferentes vacunas contra *Clostridium* spp. en plaza aprobadas por MGAP, hoy en día encontramos 23 vacunas de los laboratorio: CDV Vacunas, Rosenbusch, Biogénesis Bagó, Mabilier, Virbac Santa Elena, Grappiolo, Lab. Uruguay, Fatro, Boehringer Ingelheim, Hipra, Zoetis, Microsules (Vademécum, 2018).

4.5.2. Inmunización contra Fiebre Aftosa

Se ha demostrado que la erradicación basada en vacunas es una estrategia factible a nivel regional y podría ampliarse a una aplicación global. Se ha encontrado que las variantes seleccionadas para las vacunas pueden no ser siempre protectoras contra las cepas de virus actuales que circulan en el campo. Para que una vacuna sea efectiva los múltiples factores como la dosis, manejo, tiempo de vacunación, el adyuvante, serotipo, subtipo, vida útil, el administrador, tienen que estar correctos (Smith y col., 2014).

Las vacunas contra la fiebre aftosa disponibles en el mercado consisten en un antígeno purificado inactivado de etilenimina binario (BEI), virus muerto, desprovisto de las proteínas NS virales y formulado con adyuvantes como vacuna monovalente o multivalente, existen emulsiones de base acuosa y de base oleosa. La vacuna formulada es sensible al calor, por lo que requiere una cadena de frío desde el almacenamiento hasta el punto de uso (de los Santos y col., 2018).

Un estudio de Namaa y col. (2009), demuestra que la vacunación de dos semanas previas o en

simultáneo contra el virus de la viruela de las ovejas (SPV) y fiebre aftosa en terneros, induce una mejor respuesta inmune que la inmunización sólo contra fiebre aftosa o ésta antes que la vacunación contra SPV. Indicando que el virus de la viruela de las ovejas actúa como un agente inmunoestimulante aumentando la respuesta inmune celular contra el VFA y que no hubo interferencia en cada vacuna.

En Argentina, Trotta y col. (2015) estudiaron la inmunización simultánea en ganado bovino contra FA y anthrax (*Bacillus anthracis*) encontrando que no interfiere en la respuesta de refuerzo de la fiebre aftosa, pero no se ha estudiado qué efecto conlleva la vacunación de FA con un animal portador a una enfermedad inmunosupresora.

4.5.3. Inmunizaciones contra diferentes enfermedades en bovinos infectados con BLV

Dentro de los estudios en los cuales se investiga la interacción de la infección con BLV y la inmunización contra otra enfermedad, Eriskine y col. (2010), demuestran que las vacas lecheras infectadas con BLV tuvieron una disminución de las respuestas de anticuerpos a la bacteria *E. coli* J5, y que el aumento de los títulos de IgG1 e IgG2 fueron mayores en las vacas negativas a BLV.

En un estudio en el cual se recolectó plasma para medir los títulos de IgM, IgG1 e IgG2 producidos contra herpesvirus bovino 1 (BHV1), *Leptospira hardjo* y *L. pomona*, así como para caracterizar títulos de anticuerpos neutralizantes producidos contra BHV1 y virus de la diarrea viral bovina tipos 1 y 2 en vacas BLV+ y BLV-, dió como resultado que todos los isotipos y todos los antígenos medidos mostraron un aumento temporal significativo en el título de anticuerpos después de la vacunación. Las vacas BLV+ produjeron menos IgM en comparación con las vacas BLV- y tuvieron títulos iniciales más bajos de IgM contra *L. hardjo*, *L. pomona* y BHV1, esto persistió durante todo el estudio. Las vacas BLV+ también demostraron una producción consistente de IgG1 contra los tres antígenos. La producción de IgG2 por las vacas BLV+ no fue constante en todos los antígenos, produjeron títulos iguales a BLV- de IgG2 contra *L. hardjo* y *L. pomona*. En conjunto, los datos de este estudio apoyan la hipótesis de que las vacas BLV+ no responden a la vacunación tan fuertemente como las vacas BLV- y, en consecuencia, pueden tener una inmunidad protectora reducida en comparación con vacas sanas (Frie y col., 2016).

En otro estudio de Frie y col. (2017) se emitió una respuesta inmune primaria exponiendo a vacas BLV+ y BLV- a un antígeno no infeccioso inmunoestimulador (KLH) con doble inoculación, donde se caracterizó las respuestas inmunes adaptativas primarias y secundarias y se midió la producción de anticuerpos contra el antígeno rastreando las respuestas de las células B y T. Con respecto a la respuesta inmune humoral del antígeno se midió la titulación de IgM, IgG1 e IgG2, tanto las vacas positivas y negativas a BLV tuvieron un aumento de anticuerpos para los tres, de igual forma para las IgG, pero en cambio para la titulación de IgM ante la respuesta de la primer inoculación fue menor en vacas BLV+ uniformizando para la respuesta ante la segunda inmunización. Se demostró que las vacas positivas a LBE tienen más células B circulante aumentando después de la estimulación del antígeno. Todo el estudio sugiere que las células B infectadas con BLV proliferan en respuesta a la estimulación inmune y que las vacas BLV+ tienen una respuesta inmune anormal siendo más vulnerables a otras infecciones.

5. HIPÓTESIS

Los animales infectados con el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV) responden diferente a las vacunaciones a campo contra Fiebre Aftosa y *Clostridiumperfringens* con respecto a los animales libres de BLV.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de BLV sobre la respuesta inmune humoral contra clostridiosis y Fiebre Aftosa.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el título de anticuerpos totales contra *Clostridiumperfringens* toxina alfa, beta y épsilon, y la duración de la inmunidad humoral en bovinos libres e infectados naturalmente con BLV.
- 2) Determinar el título de anticuerpos neutralizantes contra *Clostridiumperfringens* toxina épsilon, y la duración de la inmunidad humoral en bovinos libres e infectados naturalmente con BLV.
- 3) Determinar el título de anticuerpos totales, IgM, IgG1 e IgG2 contra el Virus de Fiebre Aftosa en bovinos libres e infectados naturalmente con BLV.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas

Las terneras usadas en este estudio pertenecen a un establecimiento ubicado en el sur del país, ruta 5, kilómetro 123; en LaLa Cruz, Departamento de Florida, Uruguay. Es un campo de cría de ganado Holando de diferentes productores de la zona.

Las terneras al ingreso son identificadas mediante una caravana indicando su propio número y el del productor, entran con aproximadamente 8 meses de edad y permanecen alrededor de 18 meses, egresando aproximadamente entre 24-26 meses, donde se regresa a su procedencia original con 7 meses de gestación. Las mismas comenzaron el estudio con un peso promedio de $162 \pm 18\text{Kg}$ y finalizaron el año de seguimiento como vaquillonas con peso promedio de $331 \pm 19\text{Kg}$.

Cuando ingresan las terneras son pesadas, desparasitadas y quedan juntas en un lote de cuarentena sobre pasturas. Luego según el peso ingresan al rodeo general.

Como medidas higiénico-sanitarias habituales se sumergen en desinfectantes las agujas de las jeringas multidosis, material de descorne, material quirúrgico, guantes, o cualquier material que entre en contacto con sangre. El establecimiento no tiene como requisito de ingreso serología negativa a BLV.

8.2. Toma de muestras y grupos de ensayos

Se utilizaron muestras de sangre obtenidas por venopunción de la vena coccígea de bovinos hembras Holando entre 6 y 8 meses de edad, sin antecedentes de vacunación contra *Clostridium perfringens* y Fiebre Aftosa. Las muestras fueron extraídas en tubos con y sin anticoagulante, rotulados correctamente y centrifugados a 2200 rpm por 20 minutos. Luego fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Se conformaron 2 grupos de trabajo para cada ensayo, uno para el estudio de Clostridios y otro para el de Fiebre Aftosa, cada uno con su correspondiente subgrupo según status de anticuerpos para BLV medido por ELISA indirecto previo a las inmunizaciones:

- 1) Grupo para *Clostridium perfringens* (n = 48):
 - A) n = 19 (animales seronegativos a BLV, BLV-)
 - B) n = 29 (animales seropositivos a BLV, BLV+)

- 2) Grupo para Fiebre Aftosa (n = 35):
 - A) n = 20 (animales seronegativos a BLV, BLV-)
 - B) n = 10 (animales seropositivos a BLV, BLV+)
 - C) n = 5 (animales que eran BLV- el día 0 del estudio y luego seroconvirtieron a lo largo del estudio, SC)

Estos fueron identificados en el rodeo y se les realizó su seguimiento. En el caso de clostridiosis se aprovecharon las vacunaciones estratégicas del campo contra la misma, las mismas fueron 3 dosis, los días 0, 30 y 150. Se obtuvieron las muestras (extracción de sangre) en el momento de la primoinmunización (día 0) y luego a los días 30 (*booster*), 60, 90, 180 (aproximadamente a los 6 meses) y al año (12 meses) 365 días posvacunación (dpv); para el

caso de Fiebre Aftosa la cual es una enfermedad infectocontagiosa bajo campaña sanitaria obligatoria en Uruguay, las vacunaciones fueron realizadas según legislación vigente de ese año en el mes de mayo, los otros períodos de campaña sanitaria no fueron dentro del estudio. Se realizó la toma de muestras el día 0, 15, 60, 165 y 300 dpv.

8.3. Vacunas empleadas

Para Clostridios se utilizó una vacuna comercial con varios toxoides y bacterinas, entre ellos *Clostridiumchauvoei*, *Clostridiumsepticum*, *Clostridiumhaemolyticum*, *Clostridiumnovyi*, *Clostridiumordellii*, *Clostridiumperfringens* tipo B, *Clostridiumperfringens* tipo D. La dosis fue de 2 cc vía subcutánea en la tabla del cuello.

Para Fiebre Aftosa se usó una vacuna comercial con adyuvante oleoso (agua en aceite) proveniente de Paraguay, la misma contiene dos cepas de virus de la fiebre aftosa inactivadas: O1/Campos y A24/Cruzeiro, producida en cultivos de suspensión de células BHK-21 (BHK). Esta vacuna fue aprobada y suministrada por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, de acuerdo con las regulaciones nacionales vigentes de Uruguay. La administración es por parte del productor por lo general, pero en el caso del predio en estudio la misma es suministrada por el Dr. Veterinario a cargo, y la dosis por animal fue de 2cc vía subcutánea en la tabla del cuello del lado izquierdo.

8.4. Hemograma

Se realizó en los tres primeros muestreos de cada ensayo, tanto para clostridios como para Fiebre Aftosa, hemograma a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el fin de detectar animales con leucocitosis o linfocitosis persistente al inicio del experimento, utilizando el protocolo descrito por Marshak (1968).

8.5. ELISA para la detección de anticuerpos contra BLV (IDEXX Laboratories, Inc., USA)

Se utilizó la técnica ELISA indirecto (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima) empleando un kit comercial de IDEXX (REF P02110-10, LOT 4155N, Países Bajos) para detección de anticuerpos totales contra la gp51 del BLV en muestras de suero bovino. Las microplacas están recubiertas con antígeno de BLV, y las muestras fueron diluidas y procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), donde luego se realizaron los cálculos correspondientes a los controles para validar el ensayo. Se usaron tres controles positivos débiles por placa y se realizó la interpretación de acuerdo al protocolo del fabricante. Ésta prueba tiene un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad.

8.6. ELISA para la detección de la toxina alfa, beta y épsilon de *Clostridiumperfringens* (Bio – X Diagnostics, Belgium):

Para evaluar la respuesta a la vacunación (respuesta inmune humoral) contra la toxina, alfa, beta y épsilon de *Cl. perfringens* se utilizaron kits comerciales de ELISA de bloqueo (Bio-X Diagnostics BIO K222/2-toxina alfa, BIO K317/2-toxina beta y BIO K291/2-toxina épsilon; Rochefort, Bélgica) para detectar anticuerpos bovinos específicos contra dichas toxinas. Cada microplaca tiene añadida la toxina específica de *Cl. perfringens* con previa sensibilización de

la misma a los anticuerpos monoclonales correspondientes; se usó como conjugado anticuerpos monoclonales específicos contra las toxinas de *Cl. perfringens* acoplado a peroxidasa. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante y su lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Los resultados fueron calculados como el porcentaje de inhibición (% inh) de cada toxina: (D.O negativos – D.O positivos) / D.O negativos*100, expresando el título de anticuerpos y se determinó el grado de positividad según las indicaciones del fabricante observadas en la cuadro 1.

Tabla 1: grado de positividad para BLV según porcentaje de inhibición (% Inh). Nivel cero equivale a ausencia de anticuerpos.

Nivel de Positividad	Porcentaje de Inhibición (%Inh) valor calculado	Numeración asignada
0	menor a 20	0
+	entre 20 y 40	1
++	entre 40 y 60	2
+++	entre 60 y 80	3
++++	mayor a 80	4

8.7. Seroneutralización (SN) *in vitro* para detección de anticuerpos neutralizantes anti-toxinaepsilon de *Clostridiumperfringens*

Por otro lado, se utilizó la técnica de SN *in vitro*, para cuantificar los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon de *Cl. perfringens*. Se empleó la línea celular Madin-Darby CanineKidney (MDCK). La misma se realizó en la Universidad Federal de Minas Gerais – Brasil en un laboratorio de referencia para la enfermedad. Se utilizó una serie de pool de sueros y el límite de detección de anticuerpos del ensayo fue de 0.4 UI/mL, por lo tanto, pools de sueros con concentraciones menores a 0.4 UI/mL fueron considerados como cero UI/mL.

8.8. ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) para la determinación del título de anticuerpos estructurales contra el Virus de Fiebre Aftosa (VFA).

Se utilizó un kit comercial de LP-ELISA (ICT- MILSTEIN, CONICET-Argentina) Cod: K-FLC-A24, A2001 con alcance a las cepas de Fiebre Aftosa A24/Cruzeiro. El estudio se realizó en el laboratorio de Virología de INTA Castelar - Argentina con la cooperación de la Dra. Alejandra Capozzo. Las respuestas totales de anticuerpos anti-VFA A24 / Cruzeiro fue analizada en muestras de suero mediante LPBE (ELISA de bloqueo en fase líquida) según el manual de la OIE usando un antisuero de conejo contra VFA para capturar la partícula viral inactivada completa (140S) y un antisuero de ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo detector, ambas cepas específicas descritas por Bucafusco y col. (2014). La reacción fue detenida y leída en un lector a 405 nm, cada placa fue validada usando cinco

sueros controles y los títulos de anticuerpos fueron expresados como el log10 de la inversa de la dilución de suero que otorga el 50% de densidad óptica (absorbancia) registrada en los pocillos de control del virus sin suero, un 100% de virus.

8.9. ELISA para la determinación de IgG1 e IgG2 para VFA

Para la determinación de anticuerpos del tipo IgG1 e IgG2 específicos para VFA se utilizaron ELISAs indirectos desarrollados en INTA-CASTELAR (Lavoira y col., 2012), con diferencia del tipo de conjugados. Los mismos utilizaron anticuerpos conjugados con HRP anti IgG1 bovina (dilución 1:750) o anti IgG2 (dilución 1:750) bovina (ambos de AbDSerotec, Oxford, Reino Unido) respectivamente unidos a peroxidasa.

Las placas de ELISA Grenier Bio One, Monroe, NC (GBO) High Binding se sensibilizaron con VFA cepa A24 / Cruzeiro inactivado y purificado, se recubrieron los 96 pocillos con 50 ul de dilución con 15 ng / pocillo de partículas de VFA 146S purificadas con gradiente de sacarosa de la cepa Cruzeiro A24, y se bloquearon con tampón de dilución. Los títulos se expresaron como la dilución inversa que alcanzaba el valor de corte (0.2) calculado como la DO media + 2SD lograda por las muestras de suero bovino patagónico negativo para el virus de la fiebre aftosa. Los títulos se expresan como el factor de dilución de alcanzar el valor de corte. La lectura de las densidades ópticas se realizó con un lector automático para microplacas Multiskan EX (Labsystems) utilizando una longitud de onda de 405 nm.

8.10. ELISA para la determinación de IgM para VFA

El protocolo para determinar el título de IgM específica de VFA es similar al utilizado para IgG1 e IgG2, la diferencia está en que cada suero fue incubado en presencia o ausencia de virus en placa. Para detectar las IgM se utilizó un anticuerpo de oveja anti-IgM bovina conjugado con peroxidasa en una dilución de 1:5000. Los valores de absorbancia que se obtuvieron en cada dilución de cada suero de las placas sin virus fueron restados a los valores obtenidos en sus respectivas réplicas en las placas con virus, obteniéndose un valor de absorbancia corregida que fue utilizado para determinar el título de cada suero.

8.11. ELISA de avidéz en dilución simple

La evaluación de avidéz de anticuerpos específicos fue realizada según lo descrito por Lavoira y col., 2012, a 15 dpv. El índice de avidéz (IA) fue calculado como el porcentaje de avidéz residual de las muestras de suero luego de un lavado con urea de 20 minutos en relación a una muestra no tratada: $IA\% = (OD \text{ muestra con urea} / OD \text{ muestra sin urea}) * 100$. La lectura de las densidades ópticas se realizó con un lector utilizando una longitud de onda de 405nm.

8.12. Elaboración de registros y análisis estadísticos

Mediante el empleo de Microsoft office Excel se elaboraron planillas donde se identificaron a cada animal con un número, los resultados para BLV se expresaron como positivos o negativos, los resultados para la toxina alfa, beta y épsilon de *Cl. perfringens* se expresaron como porcentajes de protección que van desde 0% a 100%, y se expresó el título correspondiente para cada isotipo de anticuerpo contra Fiebre aftosa.

Se trazaron los títulos totales obtenidos mediante ELISA LPBE, los títulos de los subtipos de inmunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgM) en el transcurso del tiempo, subtipos para Fiebre Aftosa y los resultados entre los tres grupos experimentales se compararon mediante medidas repetidas ANOVA de 2 factores seguidas por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los porcentajes de inhibición obtenidos anti-toxinas *Cl. perfringens* se analizaron por análisis de varianza de dos factores seguido por el test de Bonferroni.

Se utilizó la prueba de Mann-Whitney cuando se compararon los resultados de los grupos. El intervalo de confianza fue del 95%, el nivel de significancia fue de $p < 0.05$ y los valores de p comprendidos entre 0,05 y 0,10 se consideraron como tendencia. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPadPrism v5.0 (GraphPad Software). Para comparar las técnicas de diagnóstico de ELISA y SN para la toxina épsilon del *Cl. perfringens* se utilizó el programa de libre acceso WinEpi y se calculó el coeficiente Kappa.

El "porcentaje de protección esperado" (EPP) se utilizó como referencia de respuestas protectoras inducidas por vacunas. El EPP relaciona los títulos de anticuerpos medidos por LPBE a 60 dpv, con los porcentajes de protección alcanzados para los mismos grupos de animales después de experimentos de desafío *in vivo* realizados a 90 dpv después de la prueba de "protección contra la infección generalizada del pie" (PGP). Los títulos de LPBE correspondientes a los valores de $EPP = 75\%$ (EPP-75%) son 1,90 para la cepa A24 / Cruzeiro (Maradei y col. 2008).

8.13. Protocolo de experimentación animal

Los protocolos experimentales para los estudios de ganado a realizarse en este trabajo fueron aprobados por Comisión Honoraria de Experimentación animal (CHEA)-Universidad de la República Oriental del Uruguay (número de aprobación PI 07/14-Exp. 111130-000302/14).

9. RESULTADOS

9.1. Clostridiumperfringens

9.1.1. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los grupos BLV+ y BLV- de animales y resultado del hemograma

Los animales seropositivos y seronegativos se mantuvieron iguales a lo largo de todo el estudio. BLV- n = 19 (animales seronegativos a BLV) y BLV+ n = 29 (animales seropositivos a BLV) y no presentaron linfocitosis persistente al inicio del experimento (Fig. 2).

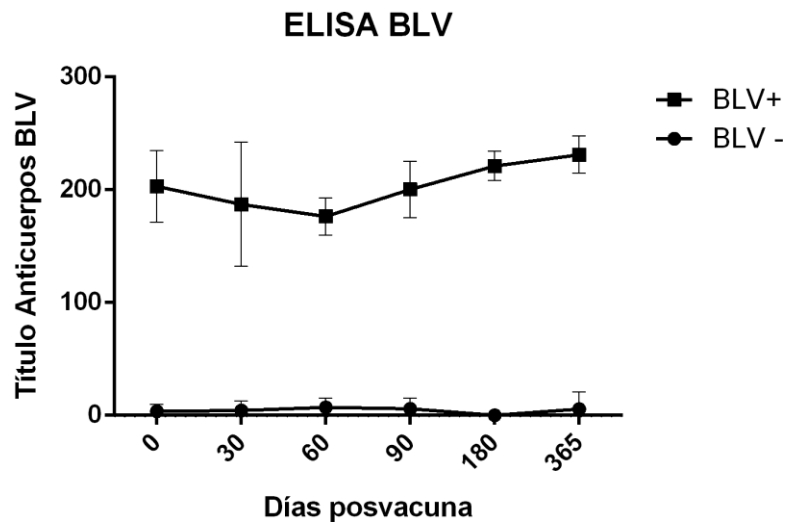


Fig. 2. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo. Animales BLV+ en cuadrados negros, animales BLV- en círculos negros. El eje de las ordenadas son los títulos de anticuerpos, el eje de las abscisas son los días post vacunación. BLV- n = 19 (animales seronegativos a BLV) BLV+ n=29 (animales seropositivos a BLV).

9.1.2. Respuesta de los animales a la vacunación contra *Clostridiumperfringens*

Luego de la primoinmunización con la vacuna polivalente comercial para *Clostridiumperfringens*, se evidenció a los 30 dpv un aumento claro en el título de anticuerpos únicamente contra la toxina épsilon. Para las demás toxinas (alfa y beta), el efecto de la primovacunación a los 30 dpv, no fue significativo según los resultados obtenidos por ELISA. Sin embargo, luego de la revacunación (día 60), se encontró un aumento significativo de los anticuerpos contra las tres toxinas analizadas con niveles de positividad entre + y +++ para las toxinas alfa, beta y épsilon. Luego de ese periodo, la cinética en los títulos de anticuerpos contra las tres toxinas, tuvieron un comportamiento diferente en cada grupo (toxinas alfa, beta y épsilon). En el caso de los anticuerpos contra la toxina alfa, los títulos continuaron aumentando hasta el día 365. Para el caso de la toxina beta, los títulos cayeron hacia el día 90 y se mantuvieron bajos en niveles 0 de positividad hasta el final del experimento. Finalmente, para la toxina épsilon, luego de disminuir hacia el día 90, se evidenció un aumento en los títulos de anticuerpos al día 180, que luego disminuyeron hacia el final del experimento (Fig. 3).

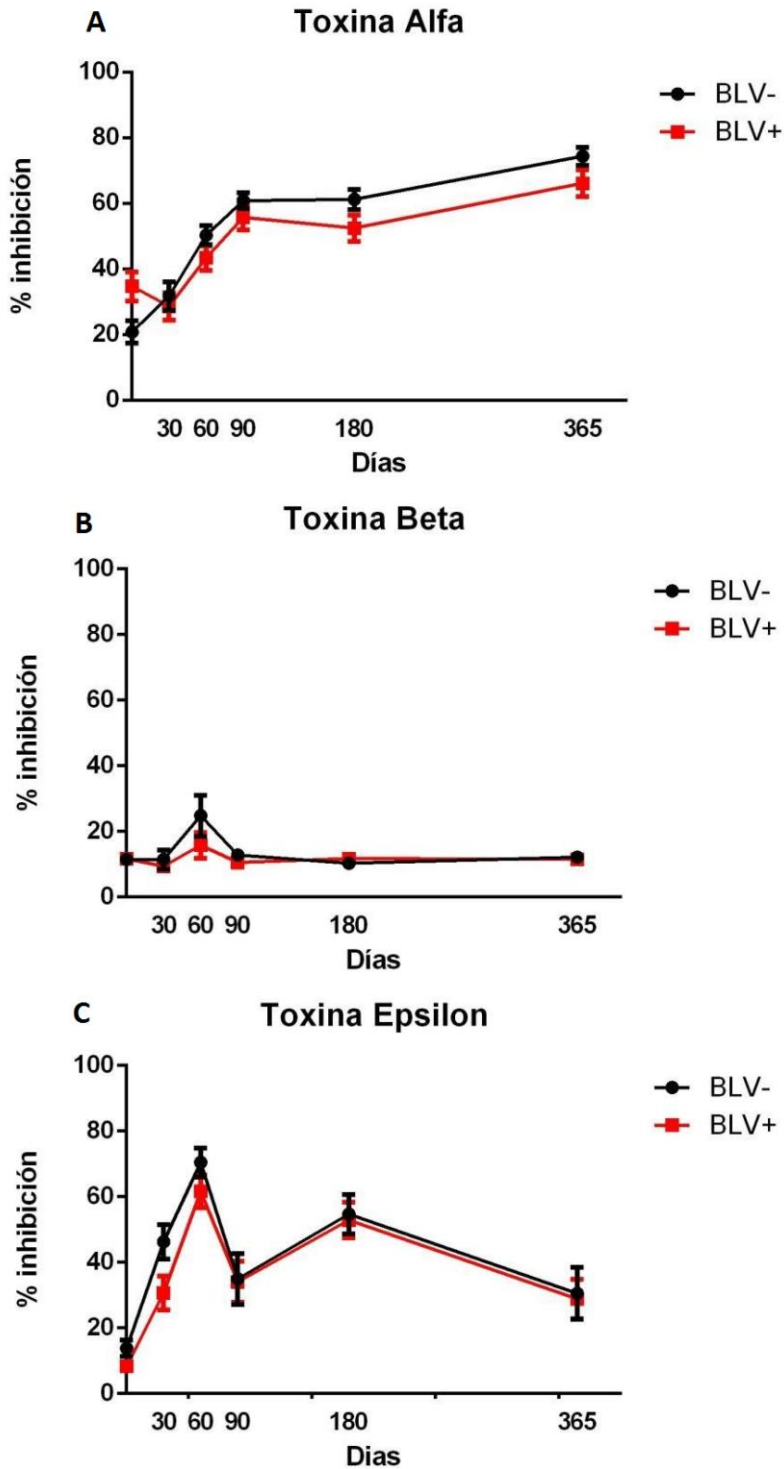


Fig. 3. Porcentaje de Inhibición anti *Clostridiumperfringens*, determinado por ELISA de bloqueo. 3a. Toxina Alfa del *Clostridiumperfringens*. 3b. Toxina Beta del *Clostridiumperfringens*. 3c Toxina Épsilon del *Clostridiumperfringens*. Círculo negro grupo seronegativo, cuadrado rojo animales seropositivos. No hubo diferencias significativas entre grupos seronegativo y seropositivos al virus de la Leucosis bovina (BLV) $p > 0.05$.

9.1.3. Respuesta a los diferentes antígenos de *Clostridiumperfringens* según status a BLV

El título de anticuerpos generado luego de las inmunizaciones contra *Clostridiumperfringens* en bovinos infectados naturalmente con BLV no difirió significativamente del título de anticuerpos de bovinos seronegativos para las tres toxinas en todo el estudio ($p>0.05$) (Fig. 3). Al inicio del experimento (día 0), tanto los animales libres como los infectados con BLV presentaron niveles bajos de anticuerpos contras las tres toxinas del *Clostridiumperfringens* (alfa, beta y épsilon) que se interpretaron como “niveles 0” de positividad según el kit de ELISA utilizado (Bio-x Diagnostics - Belgium).

Se observó diferente cinética en la curva de anticuerpos entre las tres toxinas analizadas, y entre grupos (BLV+ y BLV-) fue similar para las tres toxinas analizadas (Fig. 3a, b, c). La duración de la inmunidad fue similar entre grupos (BLV+ y BLV-). Para la toxina épsilon se observó un descenso del título de anticuerpos aproximadamente a los 90 días, mostrando posteriormente un leve aumento de anticuerpos luego que los animales fueron revacunados a los 150 días (Fig. 3c). En el grupo BLV- el título de anticuerpos contra esta toxina fue mayor (nivel de positividad ++) que el grupo BLV+ (nivel de positividad +). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). No se observó dicho comportamiento para la toxina alfa, en la cual el título de anticuerpos aumentó a lo largo de todo el estudio (Fig. 3a). En cuanto a la respuesta inmune contra la toxina beta del *Cl. perfringens*, se observó una menor respuesta comparada con los resultados de las toxina épsilon y alfa, teniendo la toxina beta el porcentaje de inhibición por debajo del 20 % correspondiente a un grado de positividad de 0 (Fig. 3b) y no respondiendo a la revacunación.

9.1.4. Anticuerpos neutralizantes anti-toxina épsilon del *Clostridiumperfringens*

Los anticuerpos contra la toxina épsilon se midieron además por seroneutralización *in vitro*. Se observó un bajo título de anticuerpos neutralizantes tanto para el grupo seropositivo como el seronegativo durante todo el ensayo. Al día 0 no hubo reacción protectora y luego de la primo-vacunación a los 30 días se observaron bajos títulos anticuerpos neutralizantes que fueron aumentando a los 60 días luego de la inmunización siendo en este punto la obtención del mayor título. Esta diferencia fue mayor numéricamente en los animales seropositivos a BLV, pero no fue significativa. A los 90 días del ensayo ya no se observó protección contra la toxina en ninguno de los dos grupos, al igual que a los 180 días nuevamente se observaron bajos títulos de anticuerpos neutralizantes, posteriores a la revacunación (Tabla 2).

Tabla 2. Seroneutralización de la toxina épsilon. Análisis de concordancia entre SN y ELISA, coeficiente kappa 0.176 (0.084 - 0.268). Neutralización UI/ml.

TIEMPO	BLV +(UI/ml)	BLV -(UI/ml)
Día 0	0	0
Día 30	0.12	0.09
Día 60	0.66	0.4
Día 90	0	0
Día 180	0	0

9.1.5. Concordancia entre las técnicas para la detección de anticuerpos contra la toxina épsilon del *Clostridium perfringens*

Se realizó un análisis de concordancia entre las técnicas ELISA y seroneutralización *in vitro*. La asociación entre las técnicas fue bajo con un coeficiente Kappa 0.176 (0.084-0.268). Considerando a la seroneutralización como técnica patrón, el kit de ELISA utilizado tiene una sensibilidad de 90.6 % y una especificidad de 44.8%, queriendo decir con esto que un resultado positivo (presencia de títulos de Ac) tiene 25.4% chances de ser realmente positivo (valor predictivo positivo), en cambio un resultados negativos (nulo-bajo título de Ac) tiene un 95.8% de ser realmente negativo (valor predictivo negativo).

9.2. Fiebre Aftosa

9.2.1. Anticuerpos totales contra BLV y resultados de hemograma

Los grupos BLV + y BLV- permanecieron seropositivos y seronegativos, respectivamente, mientras que el grupo SC seroconvirtió durante el estudio entre los días 15 y 150 del experimento (Fig. 4). Ningún animal mostró leucocitosis o linfocitosis al comienzo del experimento, que se confirmó mediante hemograma en PBMC.

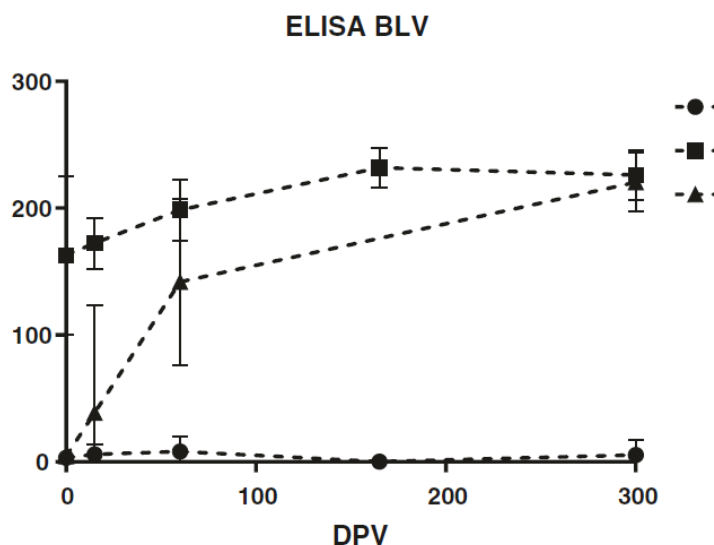


Fig. 4. Cinética de los títulos de anticuerpos para BLV de cada grupo de animales a lo largo del estudio medido por ELISA indirecto. Se representan los errores estándar de los títulos medios (SEM). Los animales BLV- y BLV+ fueron negativos y positivos respectivamente a lo largo del experimento. El grupo "BLV seroconvertido" corresponde a animales que fueron seronegativos al comienzo del experimento y se convirtieron en seropositivos a BLV a 60 dpv. Círculo negro son los BLV-, cuadrado negro son los BLV+ y los triángulos negros es el grupo BLV seroconvertido. En el eje de las ordenadas o eje vertical están los títulos de anticuerpos y en el eje de la abscisa están los días post vacunación.

9.2.2. Anticuerpos totales de VFA

Las curvas de cinética de LPBE fueron similares entre los tres grupos hasta el día 300 del ensayo. Los títulos de anticuerpos totales aumentaron después de la vacunación en todos los animales y esta diferencia fue significativa a los 15 dpv para cada grupo en comparación con los títulos medidos a 0 dpv ($p < 0,01$). Después de eso, los títulos disminuyeron y permanecieron en niveles bajos hasta el final del experimento.

Los niveles de anticuerpos cayeron por debajo del EPP 75% - los niveles de protección para la fiebre aftosa después de 60 dpv (Fig. 5a). Los títulos totales de LPBE de FA 15 dpv no fueron significativamente diferentes entre los grupos ($p > 0.05$), aunque los títulos fueron más altos en el grupo BLV- comparado con el grupo BLV+ (Fig. 6a). Las curvas cinéticas de los índices de avidéz fueron comparables entre los grupos. La avidéz de anticuerpos se incrementó a los 15 dpv, y la tendencia parecía ser mayor para los animales BLV-, sin embargo, las diferencias no fueron significativas en comparación con los animales BLV+ (Fig. 6e). El grupo SC se comportó como animales BLV-, tanto para anticuerpos totales como avidéz.

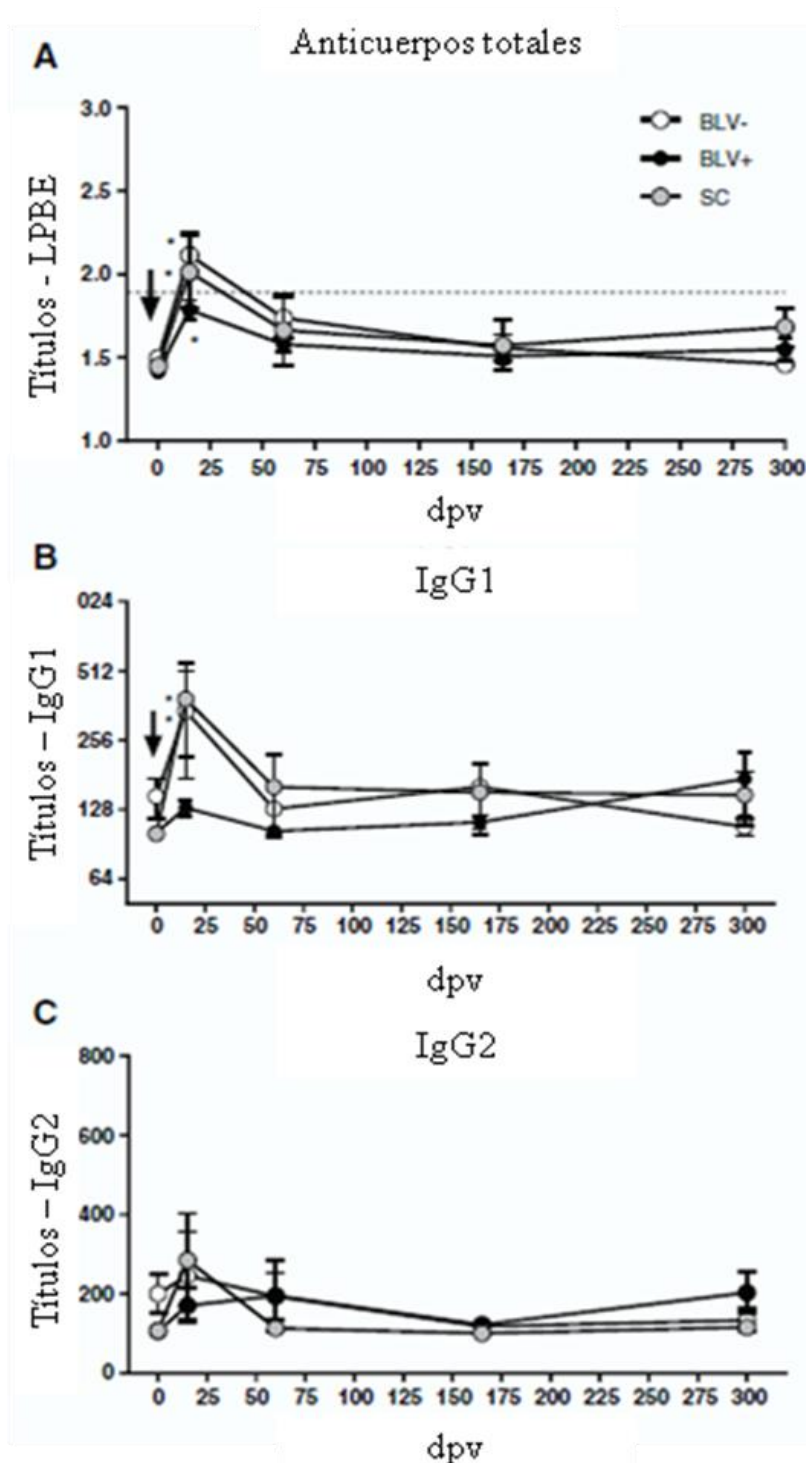


Fig. 5. Cinética de los títulos de anticuerpos contra la cepa A24 / Cruzeiro del VFA en seronegativos BLV (BLV-; n = 10; círculos blancos), seropositivos BLV (BLV +; n = 20; círculos negros) y grupo seroconvertido (SC; n = 5; círculos grises). Se representan los errores estándar de los títulos medios (SEM). A) Anticuerpo total medido por LPBE. Se considera que un título de 1,90 (línea de puntos) está relacionado con un EPP del 75% para la cepa A24 / Cruzeiro. B) IgG1 y C) IgG2 medidos por ELISA. Todos los animales recibieron una dosis de una vacuna bivalente comercial contra la fiebre aftosa a los 0 dpv. Los títulos contra A24 / Cruzeiro fueron significativamente más altos en todos los grupos a 15 dpv en comparación con 0 dpv ($p < 0.01$).

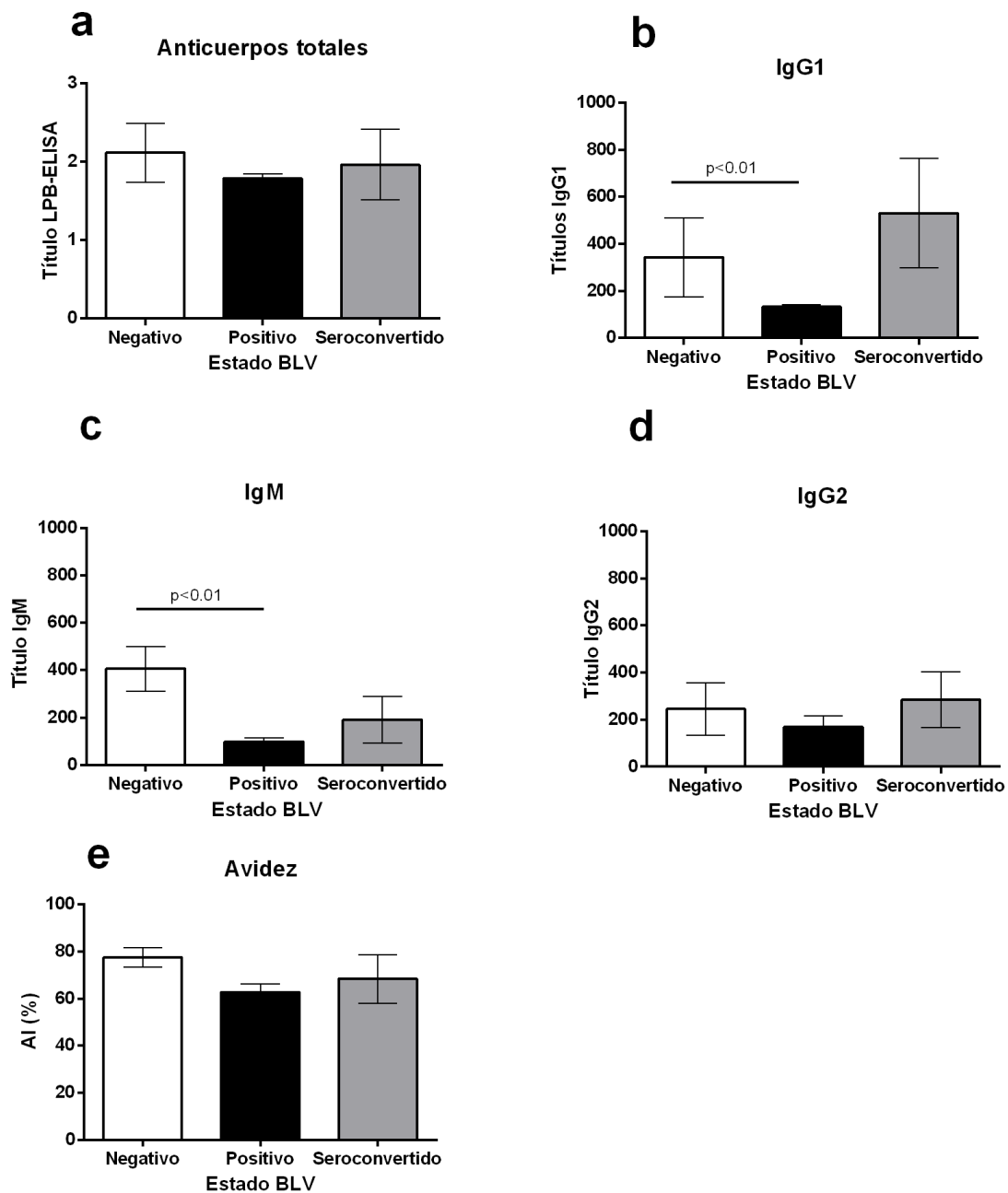


Fig. 6. Comparación de LPBE (a), isotipos (IgG1) (b), IgM (c), IgG2 (d) e índice de avidéz (e) contra la cepa A24 / Cruzeiro para (BLV-; n = 10; columnas blancas), BLV seropositivo (BLV +; n = 20; columnas negras) y grupo seroconvertido (SC; n = 5; columnas grises) a los 15 dpv. Se representan los títulos medios \pm errores estándar (SEM). Todos los animales recibieron una dosis de una vacuna bivalente comercial contra la fiebre aftosa a 0 dpv. IgM e IgG1 contra A24 / Cruzeiro fueron significativamente mayores en BLV - en comparación con BLV + a 15 dpv ($p < 0,01$, prueba de Mann-Whitney).

9.2.3. Respuestas de isotipo frente a la cepa A24 / Cruzeiro

Luego se estudió la composición del isotipo de los anticuerpos inducidos, para verificar la respuesta primaria (IgM) y el cambio hacia los isotipos IgG, indicativos de la colaboración de las células T. El título de IgM, IgG1 e IgG2 frente a la cepa A24 / Cruzeiro se midió en muestras de suero de los diferentes grupos a lo largo del tiempo.

Se observó un aumento en los títulos séricos de IgM anti-VFA a los 15 dpv en todos los grupos, siendo significativamente mayor en animales BLV- (Fig. 6c). Los títulos de IgG1 también fueron más altos para los animales BLV- en comparación con los animales BLV+ a los 15 dpv ($p < 0,01$), con un título medio de 287,1 y 127,8, respectivamente (Fig. 6b).

Luego de esto y a lo largo del estudio, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 5b). Los títulos y la cinética de IgG2 fueron similares en todos los grupos (Fig. 5c). Se observaron títulos de anticuerpos más elevados a 15 dpv en animales BLV-, con un título medio de 229,3 comparado con 174,6 de animales BLV+ (Fig. 6d), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). En todos los casos, el grupo SC se comportó como animales BLV- en términos de respuestas de isotipo.

10. DISCUSIÓN

La Leucosis Bovina es la principal virosis que afecta al rodeo lechero de nuestro país. El BLV es de importancia mundial por su gran distribución e incidencia en los rodeos lecheros. El 90% de los animales infectados son asintomáticos (60% aleucémicos y 30% linfocitosis persistente), produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones importantes en el sistema inmune (Bartlett y col., 2013). La infección por BLV puede afectar el sistema inmune innato, adaptativo y las células no infectadas (Blagitz y col., 2017), y se desconoce el real impacto de dicho virus en la respuesta inmune de animales asintomáticos.

En este estudio se evaluó si el BLV modifica las respuestas humorales generadas por las toxinas alfa, beta y épsilon de la vacuna clostridial y la cepa A24 / Cruzeiro incluida en la vacuna contra la fiebre aftosa en animales infectados o libres de BLV con la aplicación de dos vacunas de uso corriente en los planes sanitarios nacionales.

Teniendo en cuenta que las enfermedades clostridiales en general son de curso rápido y en forma de brotes y tienen la característica de que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza perdurando años en el suelo y el ambiente (Robles, 1998), ocasionan muchas pérdidas económicas a los productores. Y en conocimiento que la vacunación el único método efectivo de prevención y control de las clostridiosis, merece gran importancia que la inmunización sea de la más alta calidad y genere la protección correspondiente contra la enfermedad.

Los resultados presentados indican que entre los bovinos BLV- y BLV+ no obtuvieron diferencias en la respuesta inmune para la vacuna contra *Cl. perfringens*. Si bien existen estudios donde se demuestra lo contrario como el de Archambault y col. (1989), el cual se inmunizan vacas gestantes BLV+ y BLV- para rotavirus, donde dos ejemplares BLV+ inmunizados generaron títulos de anticuerpos más bajos en suero y calostro comparados con las vacas BLV- en la misma situación. Otro estudio, demuestra que los bovinos BLV- incrementaron mucho más su respuesta de IgG2 e IgG1 comparada con los bovinos BLV+ al ser inmunizados con una vacuna comercial conteniendo *Escherichiacoli* (Erskine y col., 2010).

No pudiendo demostrar bajo las condiciones de este estudio y con las técnicas diagnósticas disponibles que las vaquillonas infectadas con BLV presentes en este ensayo presentaran una respuesta inmune (anticuerpos totales) diferente a las vaquillonas libres del virus después de recibir un plan de vacunación contra las toxinas del *Clostridiumperfringens*. En futuros ensayos se deberán evaluar discriminadamente los isotipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgG) u otros componentes del sistema inmune, para determinar si existen diferencias a otro nivel que no fueron detectadas en la presente investigación.

Para el caso de la toxina alfa el porcentaje de inhibición dela misma va en aumento a lo largo de todo el estudio, pero en cambio los títulos de anticuerpos para la toxina beta y épsilon descendieron a los 90 dpv. Estos niveles se mantuvieron en niveles de cero hasta el final del experimento para la toxina beta, en el caso de la toxina épsilon se evidenció un aumento de los títulos de anticuerpos totales a los 180 días que luego disminuyeron hasta el final del ensayo, todo medido mediante ELISA.

De acuerdo con los resultados encontrados utilizando la técnica de SN *in vitro*, siendo esta la técnica de referencia (Salvarani y col., 2010; Salvarani y col., 2013), todos los animales del estudio presentaron un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes para la toxina épsilon luego de los 60 dpv, siendo nula a los 90 y 180 dpv. Otros trabajos han encontrado disminución de los anticuerpos anti *Cl. chauvoei* luego de los 90 dpv medida por ELISA (Rivera, 2014). La poca o nula inmunidad generada por la vacuna clostridial es una problemática que se presentó en este ensayo como también en otros. Es importante tener en cuenta esto ya que es un agente común del ambiente que conlleva a pérdidas productivas importantes, el cual tiene gastos de productos que posiblemente no están colmando las expectativas y dejando expuestos a los animales a una eventual infección.

En este estudio no se mide la potencia de la vacuna, siendo una baja potencia una de las posibles causas por las cuales no se generan niveles de anticuerpos efectivos. La potencia de la vacuna es la capacidad de proteger a los animales vacunados produciendo una respuesta inmunológica contra la enfermedad. Existen métodos validados para medir esa potencia en animales de laboratorio que están correlacionados con las pruebas en animales de destino. Para el mismo se utiliza cobayos en los cuales se inmunizan y deben de sobrevivir el 80% de los mismos para ser validada la vacuna (Bermúdez y col., 2013). Pero también se puede realizar cultivo celular teniendo la ventaja de reducir drásticamente el uso de animales, una mayor sensibilidad de la prueba, una menor variación en las respuestas individuales y una disminución en la cantidad de reactivos estándar (Salvarani y col., 2010). Un ejemplo de esto es la detección de anti-épsilon-toxina por SN *in vitro* en células MDCK, siendo una opción viable para reemplazar los bioensayos en animales (Salvarani y col., 2013).

Existen varios ensayos donde demuestran que la vacunación contra *Clostridium* spp no genera la protección efectiva contra la enfermedad. En un estudio donde se inocularon conejos con células muertas con formalina de la cepa CH3 de *Cl. chauvoei* buscando anticuerpos protectores usando el método de prueba de protección pasiva de ratón con dosificación de suero intraperitoneal y exposición intramuscular posterior, encontraron que recién después de 11 días con un máximo entre los 14 y 32 dpv se detectaron anticuerpos protectores, luego a los 67 dpv ya eran indetectables (Chandler, 1975). En concordancia con lo anterior, Salvarani y col. (2010), analizaron los títulos de anticuerpos de la inmunización contra *Cl. septicum* concluyendo que la mayoría de las vacunas disponibles en Brasil son ineficaces y requieren mayores controles, ya que 5 de 9 vacunas analizadas habían llegado al umbral mínimo legal de anticuerpos protectores.

En particular, se observaron algunos animales que al inicio del experimento presentaban bajo títulos de anticuerpos, principalmente contra la toxina alfa, lo que permite suponer que estos animales estuvieron expuestos a la toxina de manera natural. A su vez, bajo las condiciones de manejo del predio se puede descartar el hecho que por motivos de falta de revacunación haya bajos título de anticuerpos para las toxinas beta y épsilon, ya que el establecimiento lleva un estricto régimen de inmunización aplicado por el Dr. Veterinario responsable.

Otro elemento a tener en cuenta es que la toxina alfa por más que tenga una titulación alta de anticuerpos protectores mediante ELISA puede no proteger al animal de la enfermedad *in vivo*. El estudio que realizó, Goossens y col. (2016) en terneros, detectó una fuerte respuesta de anticuerpos contra la toxina alfa y la perfringolisina O, 6 semanas después de la inmunización inicial con una vacuna inactivada con formaldehído y, sin embargo, solo el

suero derivado de animales inmunizados con las toxinas nativas ofreció protección contra la necrosis en un ensayo de asa intestinal. A su vez esta inactivación disminuyó la capacidad de producción de anticuerpos protectores. Por lo tanto, parece ser que al menos para las enfermedades mediadas por toxinas alfa, los títulos de anticuerpos detectados por ELISA no son una garantía de protección.

Se ha reportado como problemático la producción de vacunas que protegen contra *Clostridium* spp., debido a factores relacionados con el cultivo de estos microorganismos patógenos y cómo se comportan en condiciones anaeróbicas. Las vacunas disponibles comercialmente se basan en toxinas inactivadas y tienen muchos inconvenientes de producción, que pueden superarse mediante el uso de antígenos recombinantes (Moreira y col., 2016).

Por otro lado, en lo que se refiere al objetivo específico número tres la fiebre aftosa es una enfermedad de alta contagiosidad que causa enormes pérdidas productivas y dificulta el acceso a mercados de alta exigencia a varios países del mundo. Esta enfermedad a nivel mundial continúa siendo un problema para muchas regiones. Con respecto a América del Sur se señala que se mantienen los logros alcanzados en el proceso de erradicación. En este sentido, el 72 % de la superficie y el 88% de bovinos y bubalinos de América del Sur están libres de FA con y sin vacunación (MGAP, 2013).

Uruguay actualmente es un país libre de fiebre aftosa con vacunación desde el brote del 2003, realizando una gran inversión en la compra de vacunas (veinte millones de dosis) para la prevención de la misma, siendo el gasto en el 2018 de U\$S 13.367.049 (trece millones trescientos sesenta y siete mil cuarenta y nueve dólares americanos) (Res. N° 7/018). Es así que el País invierte millones de dólares para garantizar el mantenimiento del estado libre de fiebre aftosa otorgado por la Organización Mundial de Sanidad Animal.

La respuesta inmune de la FA a la vacunación se evalúa actualmente utilizando ELISA de bloqueo de fase líquida (LPBE). Esta técnica ofrece un alto grado de confiabilidad y seguridad para predecir la potencia de las vacunas en ausencia de virus vivos (Maradei y col., 2008; Lavoria y col., 2012). Los animales incluidos en este estudio presentaron bajos niveles de títulos de anticuerpos entre 1.4 y 1.5 para A24 / Cruzeiro en el día 0 del ensayo. Esta respuesta basal podría estar asociada a anticuerpos maternos transferidos por calostro porque los animales utilizados tenían una edad de 6 a 8 meses (OIE CT, 2018). Sin embargo, esta respuesta no interferiría con la vacuna emulsionada en aceite aplicada en este ensayo (Patil y col., 2014).

En el ensayo a los 15 dpv, cada animal seroconvirtió, con un título promedio de 1.76 y 2.12 en BLV+ y BLV- respectivamente, observándose así una respuesta clara a la primovacunación. En este estudio se desprende que la protección generada por la inmunización contra Fiebre Aftosa bajo las condiciones de este ensayo no fue la adecuada, estando por debajo del EPP mínimo (menor a 75%) para cualquiera de los tres grupos de animales (Fig. 5). Es sabido que un mayor número de estudios en los últimos años sugieren que la antigenicidad del virus de la fiebre aftosa se ve afectada por el tipo de cultivo celular utilizado para cultivar el virus in vitro. Esto hace posible que las semillas de VFA originalmente idénticas puedan divergir antigénicamente después de uno o más pasajes de cultivos de células BTT o BHK, dando lugar a partículas virales con diferencias significativas

en su capacidad para inducir protección contra el desafío homólogo del VFA (Capozzo y col., 1997).

También las respuestas inmunitarias protectoras requieren una vacuna de refuerzo cada seis meses por lo menos durante los primeros dos años de edad con la revacunación anual subsiguiente (Cox y col., 2006). En el caso de Argentina, el plan de vacunación se adapta a eso ya que indica que los animales menores reciban dos dosis anuales en dos campañas que se definen a nivel local, y los animales mayores, reciben una dosis anual (SENASA, 2018). A diferencia de Uruguay, estas medidas no entran en el plan de vacunación nacional, y especialmente en este estudio la vacunación aplicada fue de dosis única, no siendo suficiente para mantener a los animales con niveles aceptables de títulos de anticuerpos protectores contra la cepa A24 / Cruzeiro de la Fiebre Aftosa.

Con respecto a la respuesta de los isotipos, tanto los títulos de IgM como IgG1 e IgG2 aumentaron en ambos grupos, siendo significativo el aumento en el grupo BLV- a los 15 dpv, luego los grupos se comportaron de forma similar. Por otro lado, si bien encontramos que el índice de avidéz fue menor en los animales seropositivos que en el seronegativo, estas diferencias no fueron significativas. (Fig. 6e). El índice de avidéz y los títulos de IgM se midieron solo 15 dpv, ya que estos disminuyen rápidamente de acuerdo con informes previos de algunos investigadores (Lavoria y col., 2012).

En comparación a nivel de isotipos los títulos de IgM e IgG1 fueron más altos en las vaquillonas negativas a BLV a los 15 dpv, siendo significativo el aumento para la IgM. Es de destacar que el rendimiento protector de las vacunas inactivadas contra el virus de la fiebre aftosa en el ganado bovino está relacionado con su capacidad para elevar los niveles séricos del isotipo de IgG1 anti-virus de la fiebre aftosa (Capozzo y col., 1997).

La inmunomodulación ejercida sobre los linfocitos T en animales infectados con BLV puede explicar la menor magnitud de la respuesta de IgG1 anti-VFA. Se ha demostrado que las alteraciones en la expresión de citoquinas se correlacionan con la progresión de la enfermedad en infecciones retrovirales crónicas, lo que sugiere que los desequilibrios de citoquinas pueden contribuir a la progresión de la enfermedad (Kabeya y col., 2001). Pyeon y col. (1998), encontraron que la producción de citoquina Th1 se promovió en la primera etapa de la infección por BLV (serológicamente positiva sin linfocitosis persistente) que en el ganado con etapas progresivas de la enfermedad con linfocitosis persistente. También se ha demostrado que la expresión de IgG1 está regulada positivamente por IL-4 y la expresión de IgG2 está regulada positivamente por IFN-gamma (Estes y col., 2002). Por lo tanto, teniendo en cuenta que los animales utilizados en nuestro estudio eran vaquillonas jóvenes que no tenían linfocitosis persistente al comienzo del experimento y probablemente estaban en la fase temprana de la infección (perfil Th1), pensamos que puede haber influido en el interruptor subclase de inmunoglobulina. Se necesitan más experimentos para apoyar esta hipótesis.

Los animales que fueron infectados con BLV entre 15 a 60 dpv (grupo "BLVseroconvertido") no mostraron ninguna diferencia con respecto a los animales BLV negativos, lo que indica que solo una infección preexistente con BLV modificó los isotipos de anticuerpos contra la fiebre aftosa inducidos por la vacunación.

Aunque se utilizó y aplicó una vacuna comercial aprobada de acuerdo con las recomendaciones de las autoridades sanitarias uruguayas, la calidad de esta vacuna en el

momento exacto en que se aplicó no se evaluó por nuestro grupo de trabajo, en términos de carga antigénica e integridad de 140S partículas, que se sabe que son esenciales para la protección (Bucafusco y col., 2015). Por lo tanto, los datos analizados aquí corresponden al efecto de una vacuna que provoca una cobertura corta de anticuerpos circulantes dentro de niveles de protección. Este estudio es otra contribución al efecto que el BLV puede tener en la inmunización con vacunas de uso común.

Por otro lado, las vacunas contra la fiebre aftosa convencionales pueden prevenir la infección clínica, como otros antígenos muertos, no inducen una protección a largo plazo ampliamente reactiva, requieren múltiples vacunaciones para mantener niveles adecuados de inmunidad individual y colectiva, y requieren la inclusión periódica de nuevas cepas virales en la formulación de la vacuna para cubrir los subtipos virales que pueden no estar contemplados en las vacunas existentes. Otras deficiencias importantes de las vacunas inactivadas incluyen una vida útil corta, la necesidad de una cadena de frío adecuada de vacunas formuladas y las dificultades de ciertos serotipos y subtipos para crecer bien en el cultivo celular que se requiere para la producción de vacunas. La determinación de la proteína estructural VP1 como la región más antigénica del genoma viral, condujo al desarrollo de vacunas de proteína / péptido como alternativas a la vacuna inactivada. Estas vacunas no involucran virus infecciosos, pueden almacenarse fácilmente y pueden alcanzar una pureza del 95%. (Díaz y col., 2017)

A pesar de todo lo mencionado y sabiendo que la vacuna en este caso no llegó a la EPP del 75%, se sabe que el éxito en el control de la fiebre aftosa en América del Sur se ha logrado mediante la vacunación bianual con una vacuna de aceite fabricada con cepas que se aislaron hace mucho tiempo: A24 Cruzeiro / 55, O1 Campos / 58 y en algunos países también C3 Indaial / 71 (Duque y col., 2016).

11. CONCLUSIÓN

Nuestros datos sugieren que dependiendo del tipo de inmunización que se aplica al ganado, la respuesta inmune de un animal seropositivo a BLV puede comportarse diferente al animal seronegativo.

En el caso de la inmunización contra la clostridiosis, no hubo diferencias significativas en la respuesta inmune total entre los dos grupos de vaquillonas Holando con respecto al BLV. La producción de anticuerpos totales medidos por ELISA comercial, resultaron en una titulación en aumento para la toxina alfa, en cambio para la toxina beta luego de los 90 dpv disminuyó hasta el final del ensayo, en el caso de la toxina épsilon hacia los 90 días tuvo una disminución y luego a los 180 días aumentaron hasta el final del ensayo. Para esta última a su vez se presentó una respuesta pobre de anticuerpos neutralizantes mediante seroneutralización *in vitro*, técnica de referencia para la OIE.

En el caso de la Fiebre Aftosa se obtuvo una modificación de perfil de la respuesta de anticuerpos contra la misma, siendo mayor en los animales seronegativos a BLV. Los títulos de IgM e IgG1 fueron significativamente menores en vaquillonas infectadas con BLV a los 15 dpv ($p < 0.01$).

Se necesitan más estudios que utilicen vacunas de diferente potencia para entender el papel de la infección por BLV en la eficacia de la primovacunación de clostridiosis y fiebre aftosa, como también estudios del nivel de anticuerpos protectores generados y la EEP de la vacuna a nivel nacional, ya que tanto la clostridiosis como la fiebre aftosa son enfermedades de suma importancia, estando ésta última bajo campaña sanitaria nacional.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allaar J.G., Van Asten A., Gröne A. (2013). Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36(5): 449-464.
2. Archambault D., Morin G., Elazhary M. A. (1989). Possible impairment of rotavirus immune response in cattle infected with BLV. *Veterinary Record*, 124(21): 570–572.
3. Balakrishnan G. (2015). Economic impact of foot and mouth disease and management of affected animals. *North-East Veterinarian*, 14(4): 21-22.
4. Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 96: 1591–1597.
5. Bermúdez Torres J., França Ferreira S., Dutra da Silveira C. (2013). Respuesta de anticuerpos en bovinos vacunados contra *Clostridium chauvoei*, usando una vacuna comercial. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR., 41p.
6. Biéneres, D. (2012). Utilidad de la técnica de Elisa en leche para el diagnóstico de leucosis bovina enzoótica en las diferentes etapas de la lactancia de vacas lecheras. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 42p.
7. Blagitz M.G., Souza F.N., Batista C.F., Azevedo L.F.F., Sanchez E.M.R., Diniz S.A., Silva M.X., Haddad J.P., Della Libera A.M.M.P. (2017). Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Research in Veterinary Science*, 114: 109–116.
8. Buscafusco D., Di Giacomo S., Pega J., Juncos M.S., Schammas J.M., Perez-Filgueira M., Capozzo A.V. (2014). Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 32(48): 6576–82.
9. Bucafusco D., Di Giacomo S., Pega J., Schammas J.M., Cardoso N., Capozzo A.V., Perez-Filgueira, M. (2015). Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN- γ responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology*, 476: 11–18.
10. Cambronero M.R., Prado-Cohrs D., LopezSanroma M. (2017). Conceptos inmunológicos básicos aplicados a la vacunología. *Vacunas*, 18: 49–58.

11. Capozzo A.V.E., Periolo O.H., Robiolo B., Seki C., La Torre J.L., Grigera P.R. (1997). Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (VFA) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine*, 15: 624–630. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00284-8). Fecha de consulta: 5/11/2018.
12. César D. (2010). Enfermedades Clostridiales. Plan agropecuario. *Revista del Plan Agropecuario*, 135: 48-52. Disponible en: https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R135/R_135_48.pdf. Fecha de consulta: 18/7/2018.
13. Chandler H.M. (1975). Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic, and protective antigens of a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. *Infection and Immunity*, 12(1): 143–147. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-0016741357&lang=es&site=eds-live>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
14. Collazo L., Sienna R., Irabuena O., Guarino H., Navarro M., Lavarello L. (2002). Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado lechero. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p.322-325.
15. Costa R., de Oliveira A., Salardane I., Ferreira P., Cogo R., Molinari D. (2013). Soroepidemiologia da leucoseenzoótica bovina em propriedadesleiteiras do município de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, 6: 427-441. Disponible en: <https://updoc.site/download/ler-na-integra-em-pdf-jornal-brasileiro-de-ciencia-animal-5ad1ac79725cf.pdf>. Fecha de consulta: 5/7/2018.
16. Cox S.J., Voyce C., Parida S., Reid S.M., Hamblin P.A., Hutchings G., Paton D.J., Barnett P.V. (2006). Effect of emergency FMD vaccine antigen payload on protection, sub-clinical infection and persistence following direct contact challenge of cattle. *Vaccine*, 24(16): 3184-90.
17. De Brun L., Algorta A., Alvarez J.P., Puentes R. (2014). Transmisión de la Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p195-196.
18. de la Sota M.D. (2005). Manual de procedimientos Leucosis Bovina Enzoótica. Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. Disponible en:

http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/09%20Leucosis.pdf. Fecha de consulta: 26/05/18.

19. de los Santos T., Diaz-San Segundo F., Rodríguez L.L. (2018). The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease. *Current Opinion in Virology*, 29: 16–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.02.005>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
20. de Souza F.N., Blagitz M. G., Batista C.F., Weigel R. A., Sucupira M.C.A., Della Libera A.M.M.P., Latorre A.O., Ramos Sanchez E.M., Renno F.P. (2012). Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2): 221–225.
21. Días E., Mautone G. (2014). Experiencias y lecciones aprendidas en la gestión de las emergencias sanitarias por fiebre aftosa en Uruguay. Primer curso de manejo y reducción de riesgos para animales en situaciones de desastres. Facultad de Veterinaria, UdelaR. Disponible en: <http://www.bienestaranimal.org.uy/novedades1.html>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
22. Diaz-San Segundo F., Medina G.N., Stenfeldt C., Arzt J., de los Santos T. (2017). Foot-and-mouth disease vaccines. *Veterinary Microbiology*, 206: 102–112. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.018>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
23. Divers T.J., Bartholomew R.C., Galligan D., Littel C. (1995). Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. (1995). *Preventive Veterinary Medicine (Netherlands)*, 23(3-4): 133-141.
24. Duque H., Naranjo J., Carrillo C., Burbano A., Vargas J., Pauszek L., Olesen I., Sanchez-Vazquez M., Cosivi O., Allende R.M. (2016). Protection induced by a commercial bivalent vaccine against Foot-and-Mouth Disease 2010 field virus from Ecuador. *Vaccine*, 34: 4140–4144.
25. Duro Torrijos, J.L., Tuells, J. (2017). Historia de la Vacunología: Los inicios de la vacunación contra la viruela en Burgos (1801-1802). *Vacunas: Investigación y Práctica*, 18: 26–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2017.01.001>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
26. El País (2015). China sigue comprando ganado Holando en pie. Disponible en: <https://negocios.elpais.com.uy/rurales/china-sigue-comprando-ganado-holando-pie.html>. Fecha de consulta: 13/10/2018.

27. El País (2017). Llegó a China embarque uruguayo con más de 6.500 vaquillonas. Disponible en: <https://rurales.elpais.com.uy/ganaderia/llego-a-china-embarque-uruguayo-con-mas-de-6-500-vaquillonas>. Fecha de consulta: 13/10/2018.
28. El País (2018). Sigue complicada la venta de ganado Holando a China. Disponible en: <https://rurales.elpais.com.uy/exportaciones/sigue-complicada-la-venta-de-ganado-holando-a-china>. Fecha de consulta: 13/10/2018.
29. Erskine R.J., Bartlett P.C., Sabo K.M., Sordillo L.M. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International*, Article ID 915747: 1-5. doi:10.4061/2011/915747.
30. Estes DM, Brown WC. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(1-2): 1-10.
31. Felmer R., Zúñiga J., Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2): 137-141.
32. Fernandes C.H.C., de Melo L.E.H., Tenorio T.G.S., Mendes E.I., Fernandes A.C.C., Ramalho T.R.R., Moura Sobrinho P.A., Mota R.A. (2009). Soroprevalencia e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 76(3): 327-334.
33. Fernández-Ponce C., Hernández-Martínez J.D., Silvera-Redondo C. (2006). Ctla-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Salud Uninorte*, 22(2): 168-181. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsdoj&AN=edsdoj.f69aa07f518844838bc1ca441fac63be&lang=es&site=eds-live>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
34. Fischer Alpuin S. (2012). Análisis del genoma completo de la leucosis bovina obtenido a partir de un linfosarcoma. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR, 78p.
35. Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar AB, Defoiche J., Gillet N., Asquith B., Burteau C., Twizere J., Urbain P., Debaq C., Sanchez-Alcaraz M.,

- Schwartz-Cornil I., Kerkhofs P., Jean G., Thewis A., Hay J., Mortreux F., Wattel E., Reichert M., ArsèneBurny A., Kettmann R., Bangham C., Willems L. (2008). Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(1–2): 1–7.
36. Frie M.C., Coussens P. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 163: 103-114.
37. Frie M.C., Sporer K.R., Wallace J.C., Maes R.K., Sordillo L.M., Bartlett P.C., Coussens P.M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182: 125–135.
38. Frie M. C., Sporer K.R.B., Benitez O. J., Wallace J. C., Droscha C. J., Paul C. Bartlett P. C., Coussens P. M. (2017). Dairy Cows Naturally Infected with Bovine Leukemia Virus Exhibit Abnormal B- and T-Cell Phenotypes after Primary and Secondary Exposures to Keyhole Limpet Hemocyanin. *Frontiers in Veterinary Science*, 112, 4: 1-12.
39. Fulton B.E., Portella M., Radke K. (2006). Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. *Journal of Virology*, 80(16): 7873.
40. Furtado A., Rosadilla D., Franco G., Piaggio J., Puentes R., (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. *Veterinaria*, 49(191): 29-37.
41. García A., Herrera V. (2016). Detección del virus de leucosis bovina enzoótica en la mosca *Hametobia irritans* (mosca del cuerno) por la técnica de PCR. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 62p.
42. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A-B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettmann R., Willems L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4(18): 1-32.
43. González E., Bonzo E., Echeverría M., Licursi M., Etcheverrigaray M. (1999). Enzootic bovine Leukosis: development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-Elisa) in seroepidemiological studies. *Leucose Enzoótica Bovina: desenvolvimento de*

um teste ELISA indireto (ELISA-I) e sua aplicação em estudos epidemiológicos. *Revista de Microbiología*, 30(1): 37-42.

44. Goossens E, Verherstraeten S, Valgaeren B.R, Pardon B, Timbermont L, Schauvliege S, Rodrigo-Mocholi D, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez P.R, Van Immerseel F. (2016). Toxin-neutralizing antibodies protect against *Clostridium perfringens*- induced necrosis in an intestinal loop model for bovine necrohemorrhagic enteritis. *BMC Veterinary Research*, 12: 101.
45. Grubman M.J. (2006). Nuevas aproximaciones hacia el control de la fiebre aftosa: antivirales y nuevas vacunas / New approaches to control foot-and-mouth disease: antivirals and novel vaccines. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(3): 341-346.
46. Guarino H. (2001). Plan Piloto de monitoreo en lechería. Principales enfermedades infecciosas en la cuenca lechera de Florida. *Revista Plan Agropecuario*, 96:46-48.
47. Guerra A., Mugico M., Hernández L. (2017). Vacunación segura. Facultad de Enfermería, UdelaR. Editada por Ediciones Universitarias (Unidad de Comunicación de la Universidad de la República – Ucur), Montevideo, Facultad de Enfermería, 186p.
48. Guía Vet 2018-19. (2018). Vademécum de especialidades veterinarias del Uruguay. Montevideo, SINERGIA, comunicaciones integradas. MGAP, DIGESEGA, 683p.
49. Gutiérrez G. (2010). Estudio de la dinámica de la infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. 182p. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4809_Gutierrez.pdf. Fecha de consulta: 4/7/2018.
50. Gutiérrez G., Alvarez I., Politzki R., Lomónaco M., Dos Santos M.J., Rondelli F., Fondevila N., Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 151: 255–263.
51. Hopkins S.G., DiGiacomo R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Veterinary Clinician of North America: Food Animal Practice*, 13: 107-128.

52. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. (2018). Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/>. Fecha de consulta: 8/9/2018.
53. Iowa State University (2004). Epsilon toxin of Clostridium perfringens. Disponible en: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epsilon_toxin_clostridium.pdf. Fecha de consulta: 14/6/2018.
54. Jacobo R., Storani C., Cipolini M., Martínez D. (2007). Seroprevalencia de Leucosis bovina en rodeos lecheros de la provincia de Corrientes. Revista Veterinaria, 18(1): 29-32. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/4-Veterinaria/V-002.pdf>. Fecha de consulta: 6/7/2018.
55. Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. (2001). Journal of Veterinary Medical Science, 63(7): 703–8.
56. Lavoria M.A., Di-Giacomo S., Bucafusco D., Franco-Mahecha O.L., Perez-Filgueira D.M., Capozzo A.V. (2012). Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against foot-and-mouth disease virus in cattle. Vaccine, 30(48): 6845–50.
57. Libera A.M.M.P., Blagitz M.G., Batista C.F., Latorre A.O., Stricagnolo C.R., de Souza F.N. (2012). Quantification of B cells and T lymphocyte subsets in bovine leukemia virus infected dairy cows. Semina: Ciências Agrárias (Londrina), 33(4): 1487–1494. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lbh&AN=20123300322&lang=es&site=eds-live>.
58. Libera A.M.M.P., Batista C.F., Santos B.P., de Azevedo L.F.F., Blagitz M.G., de Souza F.N., Diniz S.A., Silva M.X., Haddad J.P., Sánchez E.M. (2015). Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. Veterinary Research, 46(2): 1-8.
59. Lüchter F. (2004). Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. Enfermedades infecciosas de los Rumiantes. Buenos Aires. Editorial Lüchter, F., 269p.
60. Mammerickx M., Portetelle D., de Clercq K, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. Leukemia Research, 11: 353-358.

61. Maradei E., La Torre J., Robiolo B., Esteves J., Seki C., Pedemonte A., Mattion N. (2008). Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphtovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, 26: 6577–6586.
62. Marshak R.R. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *JournaloftheNationalCancerInstitute*, 41: 243-263.
63. Mederos A. (2013). Manejo sanitario durante la cría y recría de corderos. INIA Treinta y Tres - Estación experimental del Este. Seminario de actualización técnica: producción de carne ovina de calidad. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4312/1/Ad-719-p.47-53-Mederos.pdf>. Fecha de consulta: 18/7/2018
64. Mederos A., Irigoyen D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p.19-20.
65. MERCOSUR/GMC/RES N° 9/96. Normas sanitarias para la importación y exportación de animales bovinos y bubalinos entre los estados parte del MERCOSUR. (1996). Buenos Aires, 13p. Disponible en: <https://gd.mercosur.int/SAM/GestDoc/pubweb.nsf/Normativa?ReadForm&lang=ESP&id=44EE0BB62CA54654832577530053FBD9>. Fecha de consulta: 13/10/2018.
66. MGAP-OPYPA. (2015). El desarrollo agropecuario y agroindustrial de Uruguay: Reflexiones en el 50 aniversario de la Oficina de Programación y Política Agropecuaria. Disponible en: <http://cienciassociales.edu.uy/wp-content/uploads/sites/2/2016/07/Libro-50AniversarioOPYPA.pdf>. Fecha de consulta: 13/10/2018.
67. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos (MGAP). (2009). RESOLUCIÓN N° 19. Reconocimiento de la situación sanitaria de los Miembros respecto de la fiebre aftosa. Disponible en: <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,MGAP,mgap-estatus-sanitario-animal-del-uruguay,O,es,0>. Fecha de consulta: 19/11/2018.
68. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos (MGAP). (2013). Guía para el seguimiento del plan de acción 2011-2020 del PHEFA. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-informacion-tecnica-fiebre-aftosa,O,es,0>. Fecha de Consulta: 11/10/2018.

69. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos (MGAP- DIEA). (2018). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf. Fecha de consulta: 13/10/2018.
70. Moratorio G., Obal G., Dubra A., Bianchi S., Pritsch O., Cristina J., Correa A., Buschiazzo A. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Archives of Virology*, 155(4): 481–489.
71. Moratorio G. (2012). Aspectos genómicos y evolutivos del virus de la leucosis bovina. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias - PEDECIBA, UdelaR, 180p.
72. Moreira G.M., Salvarani F.M., da Cunha C.E., Mendonça M., Moreira Â.N., Gonçalves L.A., Pires P.S., Lobato F.C., Conceição F.R. (2016). Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. *Scientific Reports*, 6: 22816. Doi: 10.1038/srep22816.
73. Morris W.E., Fernández-Miyakawa M.E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. Instituto de Patobiología, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Los Reseros y Las Cabañas, (1712) Castelar, Pcia. Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 41: 251-260.
74. Mueller-Spitz S.R., Stewart L.B., Klump J.V., McLellan S.L. (2010). Freshwater suspended sediments and sewage are reservoirs for enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16): 5556–62.
75. Murakami K., Sota Kobayashi, Misako Konishi, Ken-ichiro Kameyama, Toshijuki Tsutsui. (2013). Nationwide Survey of Bovine Leukemia Virus Infection among Dairy and Beef Breeding Cattle in Japan from 2009-2011. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(8): 1123-1126.
76. Namaa A.M., Hegazi A.Z. (2009). Immunological response of cattle vaccinated with sheep pox and bivalent FMD vaccines. Proceedings of the 2nd Scientific Conference of Animal Wealth Research in the Middle East and North Africa, Cairo International Convention Center, 24-26 October, 2009, 354–363. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lbh&AN=20103029681&lang=es&site=eds-live>. Fecha de consulta: 5/11/2018.

77. Obal G., (2014). Bases biofísicas y estructurales del ensamblado de la cápside retroviral: virus de la leucemia bovina. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UdelaR, 136p.
78. Oguma K., Suzuki M., Sentsui H. (2017). Enzootic bovine leukosis in a two-month-old calf. *Virus Research*, 233: 120–124. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.016>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
79. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - PANAFTOSA. (2010). Programa Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa PHEFA, Propuesta de Plan de Acción período 2011-2020. Rio de Janeiro, Brasil, Noviembre de 2010. Disponible en: https://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-con-contrapartes&alias=154-plan-de-accion-para-la-erradicacion-de-la-fiebre-aftosa&Itemid=253. Fecha de consulta: 11/10/2018.
80. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. (2018). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2018. Capítulo 2.4.10./ 2.1.8. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
81. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE-CT. (2018). Infección por el virus de la Fiebre Aftosa. Código Terrestre 27ª edición, 2018. Disponible en: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_fmd.htm. Fecha de consulta: 5/11/2018.
82. Patil P.K., Sajjanar C.M., Natarajan C., Bayry J. (2014). Neutralizing antibody responses to foot-and-mouth disease quadrivalent (type O, A, C and Asia 1) vaccines in growing calves with pre-existing maternal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 169(3–4): 233–5.
83. Pyeon D., Splitter G.A. (1998). Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *Journal of Virology*, 72(8): 6917–21.
84. Rama G. (2009). Aspectos sobre el diagnóstico de leucosis enzoótica bovina. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR, 40p.

85. Rivera P.M. (2014). Caracterización de la respuesta inmune humoral anti Clostridium chauvoei en bovinos. Tesina de grado. Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, 30p.
86. Robles C. (1998). Enfermedades clostridiales del ganado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/12-clostridiosis.pdf. Fecha de consulta: 18/7/2018.
87. Rodríguez Gustá A.L. (2009). Políticas públicas en el Uruguay: un modelo de gestión híbrido en el combate a la fiebre aftosa. Estudios Sociales 2009, 17 (Julio-Diciembre). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41711502005>. Fecha de consulta: 11/8/2018.
88. Salvarani F.M., Lobato Z.I.P., Assis R.A., Lima C.G.R.D., Silva R.O.S., Pires P.S., Lobato F.C.F. (2010). In vitro evaluation of Clostridium septicum alpha toxin. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 62(4): 778-783.
89. Salvarani F.M., Lobato Z.I.P., Pires P.S., Silva R.O.S., Alves G.G., Pereira P.L.L., Lobato F.C.F. (2013). In vitro potency test for evaluation of Clostridium perfringens type D epsilon toxin. Arquivos Do Instituto Biológico (São Paulo), 80(4): 450-452.
90. Sandoval R., Delgado A., Ruiz L., Ramos O. (2015). Determinación de la Seroprevalencia del Virus de la Leucemia Bovina en un Establo Lechero de Lima, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; 26(1): 152-158. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10919>. Fecha de consulta: 5/07/2018
91. Santos G., Baltazar de Oliveira, J., Friguglietti D., da Fonseca A., Mota R., Pinheiro, J. (2013). Análise Epidemiológica Da Infecção Pelo Vírus Da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na Microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, 35(4): 371-377.
92. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (2018). Fiebre Aftosa, vacunación, diferentes estrategias. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/fiebre-aftosa>. Fecha de consulta: 14/11/2018.
93. Smith M.T., Bennett A.M., Grubman M.J., Bundy B.C. (2014). Foot-and-mouth disease: Technical and political challenges to eradication. Vaccine, 32: 3902-3908.

94. Straub O.C. (1982). Transmission studies from leukotic cattle to sheep using secretions, excretions, breath and skin scrapings. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, 15: 299-309.
95. Suzuki S., Konnai S., Okagawa T., Ikebuchi R., Nishimori A., Kohara J., Mingala C., Murata S., Ohashi K. (2015). Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163: 115–124.
96. Tizard I. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª ed. Barcelona, ELSEVIER, 574p.
97. Trotta M., Lahore J., Cardoso N., Osvaldo M., Catena, Pérez-Filgueira M., Fernández F., Capozzo A.V. (2015). Simultaneous immunization of cattle with foot-and-mouth disease (FMD) and live anthrax vaccines do not interfere with FMD booster responses. *Trials in Vaccinology* 4: 38-42.
98. Tsutsui T., Kobayashi S., Hayama Y., & Yamamoto T. (2016). Short communication: Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 124: 96–101.
99. Uzal F. (2013). Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría*. p65-70. Disponible en: <http://centromedicoveterinariopaysandu.com/wp-content/uploads/2016/02/Dr-Francisco-A-Uzal.pdf>. Fecha de consulta: 19/12/2018.
100. VanLeeuwen J.A., Tiwari A., Plaizier J.C., Whiting T.L. (2006). Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal*, 47: 783–786.
101. Veiga de Cabo J., de la Fuente Díez E., Martín Rodero H. (2007). La Real Expedición Filantrópica de la vacuna (1803 - 1810). *Medicina y Seguridad Del Trabajo*, 53(209): 71-84. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsdoj&AN=edsdoj.338fc8f9e0eb44f3bf55273a5bda4d6a&lang=es&site=eds-live>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
102. Zaffaroni R., Piaggio J., Nuñez A., de Freitas J., Suanes A., Cernicchiaro N., Gil A. (2007). Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica en la

cuenca lechera sur del Uruguay. V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay, p.150-151.