

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A CAMPO
FRENTE A LA VACUNACIÓN CONTRA ENFERMEDADES DE INTERÉS
REPRODUCTIVO EN VAQUILLONAS INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA
LEUCOSIS BOVINA (VLB)**

Por

Florencia Steffanía RUPPEL FUNES

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología
de los Alimentos de Origen Animal

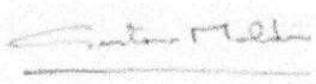
MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

T9
962

PÁGINA DE APROBACIÓN

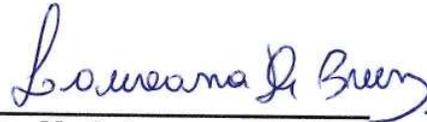
Tesis de grado aprobada por:



Presidente de mesa:

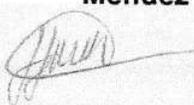
Dr. Gustavo Maldini

Segundo miembro (Tutor):



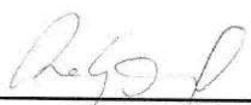
Dra. María Laureana de Brun Méndez

Tercer miembro



Dr. Uruguaysito Benavides

Cuarto miembro:



Dr. Rodrigo Puentes Palombo

Fecha:

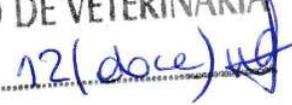
23/12/2020

Autor:



Florencia Steffanía Ruppel Funes

520698 Gomacoch comisión 13/12/2021 -

FACULTAD DE VETERINARIA
Aprobado con 12 (doce) 

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Facultad de Veterinaria por ser mi segundo hogar durante este largo periplo, darme herramientas invaluable para la vida, y permitirme crecer tanto a nivel personal como académico. Cada profesor, clase, salida de campo, y cada una de las dificultades en el camino han formado a la persona que soy hoy.

A Rodrigo por abrirme las puertas del Departamento para continuar aprendiendo sobre el “mundo microbiológico”. Gracias por guiarme y ser una gran inspiración profesional.

A Laureana por permitirme ser parte de su proyecto de Doctorado y acompañar cada paso de esta tesis. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y ser un ejemplo de empeño, trabajo y perseverancia.

A Andrés por acompañarme en el último tramo, aconsejarme y brindarme todas las herramientas necesarias para hacer los ensayos.

A todas las personas del Laboratorio que se volvieron parte de mi día a día, cada uno a su manera brindándome conocimientos desde su experiencia. Y especialmente a Fer, por siempre ser mi auxilio cuando lo necesitaba.

A mi mamá, mi gran impulsora desde siempre. Gracias por tu confianza y tu amor incondicional, que han sido mi fuerza para llegar a este momento tan especial.

A mi padre, por enseñarme a creer en mi y apoyarme en las decisiones importantes.

A los abuelos por siempre estar ahí cuando más los necesito.

A Ruth, por ser mi guía y apoyo durante estos años, y brindarme tantas herramientas. A Anita, Sonia, Ale y Adri que son mi gran ejemplo a diario, por siempre creer en mi, e insentivarme a continuar.

A las amigas que me ha dado la facultad, Kati, Tefi, Caro, gracias por acompañarme desde el principio. A lele, mi querida futura colega, por las interminables charlas pre examen, las lágrimas, pero sobre todo por las alegrías que hemos compartido.

A todos los amigos que de muchísimas maneras han formado parte de este camino.

A los animales, que despertaron en mi esta vocación tan linda.

TABLA DE CONTENIDO

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.....	12
4.1.2.1	Transmisión del agente	12
4.1.2.2	Prevalencia a nivel mundial.....	14
4.1.2.3	Prevalencia a nivel regional.....	14
4.1.2.4	Prevalencia en Uruguay.....	15
4.1.3	PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	15
4.1.3.1	Fenotipos con alta y baja carga proviral	17
4.1.4	DIAGNÓSTICO	17
4.1.5	RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR	18
4.1.6	TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCIÓN.....	20
4.1.7	IMPACTO.....	22
4.2	RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA.....	23
4.2.1	DESCRIPCIÓN DEL AGENTE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	23
4.2.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	24
4.2.2.1	Transmisión y patogenia	24
4.2.2.2	Prevalencia	25
4.2.3	DIAGNÓSTICO	25
4.2.4	RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR Y VACUNACIÓN	26
4.2.4.1	Respuesta inmune.....	26
4.2.4.2	Vacunación.....	27
4.3	DIARREA VIRAL BOVINA.....	28
4.3.1	DESCRIPCIÓN DEL AGENTE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	28
4.3.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	29
4.3.2.1	Transmisión.....	29
4.3.2.2	Prevalencia	30
4.3.3	DIAGNÓSTICO	30
4.3.4	RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR Y VACUNACIÓN	31
4.3.4.1	Respuesta inmune innata.....	31
4.3.4.2	Respuesta inmune adaptativa	32
4.3.4.3	Vacunación.....	32
5	HIPÓTESIS	34
6	OBJETIVO GENERAL	34
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
8	MATERIALES Y MÉTODOS	35
8.1	CARACTERIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO Y MEDIDAS DE MANEJO UTILIZADAS.....	35
8.2	OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	35
8.3	CONFORMACIÓN DE GRUPOS	35
8.4	HEMOGRAMA.....	36
8.5	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MEDIANTE SERONEUTRALIZACIÓN <i>IN VITRO</i> CONTRA BoHV-1	36
8.6	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE ELISA CONTRA BoHV-1	37
8.6.1	ANTICUERPOS TOTALES.....	37

8.6.2	CUANTIFICACIÓN DE ISOTIPOS IgG1 E IgG2.....	37
8.7	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES MEDIANTE ELISA CONTRA VDVB.....	37
8.8	DETECCIÓN DE ANTÍGENOS MEDIANTE ELISA CONTRA VDVB	38
8.9	ELABORACIÓN DE REGISTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
9	RESULTADOS.....	39
9.1	PREVALENCIA DE VLB EN EL RODEO.....	39
9.2	ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BoHV-1	39
9.3	ANTICUERPOS TOTALES E ISOTIPOS CONTRA BoHV-1	41
9.3.1	ANTICUERPOS TOTALES	41
9.3.2	ISOTIPOS IgG1 e IgG2.....	44
9.4	ANTICUERPOS TOTALES PARA VDVB Y PREVALENCIA DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS EN EL RODEO.....	46
10	DISCUSIÓN	47
11	CONCLUSIONES	54
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

FIGURA 1 ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UNA PARTÍCULA VIRAL DEL VLB.....	12
FIGURA 2 CINÉTICA DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) PARA ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS, MEDIANTE ELISA A LO LARGO DEL ENSAYO	42
FIGURA 3 CINÉTICA DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) EN ANIMALES VACUNADOS Y SEGÚN ESTADO PARA VLB, MEDIANTE ELISA A LO LARGO DEL ENSAYO	43
FIGURA 4 CINÉTICA DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS (ISOTIPOS IGG1 E IGG2) CONTRA HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) EN ANIMALES VACUNADOS Y SEGÚN ESTADO PARA VLB, MEDIANTE ELISA A LO LARGO DEL ENSAYO.....	45

Tablas

TABLA 1 TÍTULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MAYOR O IGUAL A 16 CONTRA HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) EN CADA SANGRADO POST-VACUNACIÓN Y SEGÚN ESTADO PARA VLB, MEDIANTE SERONETRALIZACIÓN IN VITRO	40
--	----

1 **RESUMEN**

El virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (VLB) es reconocido como el principal patógeno viral que afecta los rodeos lecheros mundialmente. El 90% de los animales infectados son asintomáticos y la infección subclínica produce trastornos importantes en el sistema inmunológico, tanto a nivel humoral como celular, modificando el perfil de células T, lo que puede contrarrestar el desarrollo de inmunidad luego de la vacunación. La Diarrea Viral Bovina (DVB) y la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) son las principales virosis que afectan a la reproducción en bovinos y en la práctica veterinaria no se tiene en cuenta la presencia del VLB como infección inmunosupresora que puede disminuir la eficacia de la vacunación contra las mismas. El objetivo de este estudio fue evaluar si la respuesta inmune humoral frente a la vacunación contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales infectados con VLB, es diferente de aquellos libres de la infección. El ensayo consistió en la inmunización de 276 vaquillonas pertenecientes a un campo de cría en el Departamento de Florida, Uruguay, con doble dosis los días -60 y -30 pre-servicio, de una vacuna reproductiva comercial polivalente contra BoHV-1 y VDVB. Posteriormente se conformaron dos grupos de vaquillonas, uno VLB+ (n=113) y otro VLB- (n=104), diagnosticadas mediante ELISA para anticuerpos. A su vez, el grupo de vaquillonas VLB+ fue subdividido en aleucémicos (VLB+ AL) y con linfocitosis persistente (VLB+ LP). Se recolectaron muestras de suero a los días post-vacunación (dpv) 0, 30, 60 y 160 y se determinaron anticuerpos totales, IgG1, IgG2 y anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 y anticuerpos totales contra VDVB. No se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$) para anticuerpos neutralizantes y anticuerpos totales contra BoHV-1 entre los grupos VLB+ y VLB-, a pesar de que se detectó una respuesta serológica a la vacunación, que fue máxima hacia el día 60. Los títulos de ambos isotipos, IgG1 e IgG2, aumentaron tanto en vaquillonas VLB+ como VLB-, evidenciándose diferencias significativas ($p=0,04$) en el título de IgG1 entre animales VLB- y VLB+ aleucémicos. En relación con el VDVB se puso en evidencia una alta seroprevalencia al inicio del ensayo (97,6%), lo que determinó una ausencia de respuesta a la inmunización. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de VLB en Uruguay, es necesario continuar investigando el impacto silencioso de este retrovirus en el desarrollo de inmunidad de los animales infectados. En este sentido, es conveniente realizar más ensayos que evalúen la eficacia de diferentes vacunas en presencia del VLB, conociendo la importancia que tiene esta práctica en la prevención de enfermedades infecciosas.

2 **SUMMARY**

Bovine Leukemia Virus (BLV) is recognized as the main viral pathogen affecting dairy herds worldwide. 90% of the infected animals are asymptomatic and the subclinical infection produces important disorders in the immune system, both humoral and cellular, modifying the T-cell profile, which can affect the development of immunity after vaccination. Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Bovine Infectious Rhinotracheitis (BIR) are the main viruses that affect reproduction in cattle, and in veterinary practice the presence of BLV is not considered as an immunosuppressive infection that can decrease the effectiveness of vaccination against them. The objective of this study was to evaluate if the humoral immune response to vaccination against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1) in animals infected with BLV is different from those free of the infection. The trial consisted in the immunization of 276 heifers belonging to a rearing field in the Department of Florida, Uruguay, with double doses on days -60 and -30 pre-service, of a polyvalent commercial reproductive vaccine against BoHV-1 and VBVD. Later, two groups of heifers were formed, one BLV+ (n=113) and another BLV- (n=104), diagnosed by ELISA for antibodies. At the same time, BLV+ group was subdivided into aleukemic (BLV+ AL) and with persistent lymphocytosis (BLV+ PL). Serum samples were collected at post-vaccination days (dpv) 0, 30, 60 and 160, and total antibodies, IgG1, IgG2 and neutralizing antibodies against BoHV-1, and total antibodies against VDVb were determined. No significant differences ($p > 0.05$) were found for neutralizing antibodies and total antibodies against BoHV-1, between BLV+ and BLV- groups, although there was serological response to vaccination, which was maximum towards day 60. Titers of both isotypes, IgG1 and IgG2, increased in both BLV+ and BLV- heifers, evidencing significant differences ($p = 0.04$) between IgG1 titers of BLV- and BLV+ aleukemic animals. With regard to BVDV, it was evidenced a high seroprevalence at the beginning of the assay (97.6%), which determined an absence of response to immunization. Considering the high prevalence of BLV in Uruguay, it's needed to continue investigating the silent impact of this retrovirus in the development of immunity of infected animals. Because of that, it's convenient to carry out more trials that evaluate the efficacy of different vaccines in the presence of VLB, knowing the importance of this practice in the prevention of infectious diseases.

3 INTRODUCCIÓN

El virus de la Leucosis Bovina (VLB) es un retrovirus exógeno reconocido como el agente causal de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) (Lüchter, 2004). Presenta distribución mundial y se trata de uno de los agentes de mayor relevancia para el ganado bovino, principalmente en rodeos lecheros. Tanto en Uruguay como en la región, la prevalencia serológica puede llegar a ser muy alta, incluso en animales jóvenes, donde nuestro grupo de trabajo encontró prevalencias del 45% en terneras de 8 meses de edad (Puentes y col., 2016a). Si bien en Uruguay no se conocen las pérdidas económicas asociadas a la presencia del VLB, se sabe que éstas incluyen muchos componentes. En Estados Unidos se ha estimado que la infección subclínica (90% de los animales infectados) produce pérdidas de 95 kg/vaca/año de leche por cada 10% de aumento en la prevalencia del virus en los tambos infectados. Esto representa pérdidas de 285 millones de dólares anuales a los productores de dicho país (Bartlett y col., 2014).

Actualmente la principal importancia de esta infección en Uruguay radica en las restricciones en los mercados internacionales a la exportación de animales en pie, lo cual ha conducido a la permanencia de animales seropositivos en los rodeos nacionales. A pesar de ello, y debido a las características de la infección, su impacto subclínico sería el de mayor relevancia y el más difícil de cuantificar. Casi el 40% del ganado infectado con VLB desarrollará linfocitosis persistente a los pocos años de la infección; sin embargo, menos del 5% desarrollará el cuadro clínico identificado como linfosarcoma maligno (Bartlett y col., 2014). Es así que, en los últimos años se ha llegado a reconocer la importancia de los animales que cursan con cuadros subclínicos. Resultados de múltiples estudios indican que la infección por VLB degrada la función linfocitaria en el ganado, lo cual conduce a la disminución en la respuesta inmune a infecciones oportunistas, así como a vacunas. Las principales células diana del VLB son los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie, además de los monocitos y macrófagos (Gillet y col., 2007).

En un trabajo llevado a cabo por Erskine y col. (2011) se demostró que vacas lecheras infectadas con VLB desarrollaron menos anticuerpos (IgG1 y en especial IgG2) como respuesta a un plan de inmunización con la bacterina J5 de *E. coli*, en comparación con el grupo de animales no infectados. Esto es consistente con informes previos que indican que VLB induce cambios en la expresión de citoquinas tipo 1 de linfocitos T CD4+ (IL2, IL12, IFN γ), y alteración en la homeostasis de proliferación celular y muerte programada, tanto de células T como linfocitos B, todo lo cual es fundamental para la competencia inmune frente a desafíos infecciosos.

Según los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo (Puentes y col., 2016b), se ha demostrado que vaquillonas seronegativas a VLB y vacunadas contra la Fiebre Aftosa desarrollaron títulos de IgM e IgG1 mayores que aquellas vacunadas y seropositivas a VLB. Por otro lado, en sus estudios Frie y col. (2016) obtuvieron resultados que demuestran que vacas VLB positivas produjeron títulos significativamente más bajos de IgM contra *Herpesvirus Bovino tipo 1*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona*, y títulos más bajos de IgG2 contra *Herpesvirus Bovino tipo 1*. Esto respalda la hipótesis que los animales positivos al VLB tienen deteriorada su respuesta inmune frente a la vacunación.

Por último, Mionetto y Rodriguez (2018) obtuvieron resultados que indican una asociación positiva entre animales seropositivos a VLB y la presencia de anticuerpos contra BoHV-1 y *Leptospira spp.* Es así que, la presencia del VLB podría tener su rol facilitando el ingreso de patógenos asociados a la reproducción, o bien disminuyendo los mecanismos inmunológicos de protección contra los mismos.

Las principales virosis que afectan la reproducción en bovinos a nivel mundial son la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y la Diarrea Viral Bovina (DVB). En Uruguay no se conocen las pérdidas producidas por dichas enfermedades, sin embargo, en países como Argentina, se ha estimado que se pierde un total de 812 millones de pesos argentinos a causa del impacto de la DVB más IBR (Pacífico y col., 2013). Ambas enfermedades se encuentran ampliamente difundidas en los rodeos lecheros de nuestro país, con prevalencias individuales estimadas en aproximadamente 36% y 77% para IBR y DVB respectivamente, y a nivel de establecimiento alrededor del 99% para IBR y 100% para DVB (Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008).

A pesar de no ser una práctica obligatoria en Uruguay, para controlar estas virosis que presentan gran impacto a nivel reproductivo, hace ya varias décadas se utilizan diversas vacunas. Si bien muchas de ellas han demostrado ser eficaces a campo, en la práctica no suele tenerse en cuenta la presencia del VLB y su impacto inmunosupresor, que puede disminuir la eficacia de la vacunación y por lo tanto la protección del rodeo.

Considerando los antecedentes mencionados, el presente trabajo busca demostrar cambios cualitativos y cuantitativos en la inmunidad humoral generada por vacunas comerciales contra enfermedades de interés reproductivo en los rodeos de Uruguay, como lo son IBR y DVB. Poder conocer dichos cambios puede representar una herramienta útil a fin de evitar mayores pérdidas económicas, optimizando métodos de prevención eficaces.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

4.1.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infectocontagiosa crónica que afecta principalmente al ganado bovino lechero, y que es producida por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) (Lüchter, 2004). Se trata de un retrovirus exógeno, de carácter oncogénico y perteneciente al género *Deltaretrovirus*, subfamilia *Ortoretrovirinae*, familia *Retroviridae*, relacionado desde el punto de vista estructural y funcional al virus T-linfotrópico humano y al virus T-linfotrópico de simios (Lefkowitz y col., 2018). A pesar de que el VLB puede infectar diferentes poblaciones de células inmunes en sangre periférica y tejido linfoide, principalmente afecta a linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M (IgM) en su superficie (Polat y col., 2017). La infección por VLB ocurre naturalmente en el ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), pero también en búfalos y capibaras. Otras especies como ovejas, cabras y conejos pueden infectarse experimentalmente (Schwartz y col., 1994a).

La partícula de VLB tiene un tamaño de entre 80 y 120 nm de diámetro, es esférica y presenta una bicapa lipídica de origen celular que la envuelve (Moratorio, 2012). Dicha bicapa lipídica interviene en el reconocimiento, adsorción y penetración del virus a la célula blanco (linfocito B), en conjunto con el complejo de proteínas virales insertadas en ella (Fischer, 2012).

El genoma viral consiste en dos moléculas de ARN simple hebra en sentido positivo, integrado por tres genes estructurales: Gag (group-associated antigen), Env (envelope) y Pol (polymerase); y una región reguladora denominada X o pX. La expresión del gen Gag codifica la proteína p24 de la cápside, el objetivo principal del huésped para generar la respuesta inmune. Además, codifica la nucleoproteína p12, que estabiliza las hebras de ARN, y a la proteína p15 de la matriz, que interactúa con la bicapa lipídica de la membrana viral. La expresión del gen Env codifica la glicoproteína de la envoltura gp51 mayor de superficie, la cual induce expresión de anticuerpos específicos en animales infectados, y la glicoproteína transmembrana gp30 de anclaje (Lairmore y col., 2014). La mayor parte de las pruebas serológicas rutinarias como inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmodifusión en gel de agar (IDGA), detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana (OIE, 2019). Por su parte, el gen Pol codifica la enzima transcriptasa reversa, una ADN polimerasa que es ARN dependiente.

El genoma se encuentra flaqueado en sus extremos por dos regiones no codificantes que contienen secuencias comprometidas en los procesos de regulación de la expresión génica viral, denominadas Long Terminal Repeats o LTRs (Moratorio, 2012). Además, una región vecina al gen Env, denominada X o pX, también se encuentra encargada de codificar diferentes proteínas reguladoras (Tax, Rex, RIII y GIV) (Polat y col., 2017), de gran importancia en la interacción virus-célula hospedero y en la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional (Juliarena y col., 2017).

El ADN del provirus, que se genera a partir de la transcripción inversa del genoma vírico, es integrado de forma aleatoria en la célula del hospedero, gracias a la acción de la enzima integrasa, donde se mantendrá latente durante toda la vida del animal. Esta integración generará progresivamente la alteración en la maduración y función normal de las células

infectadas, produciendo eventualmente una disminución de la respuesta inmune normal (Ruggiero y col., 2019).

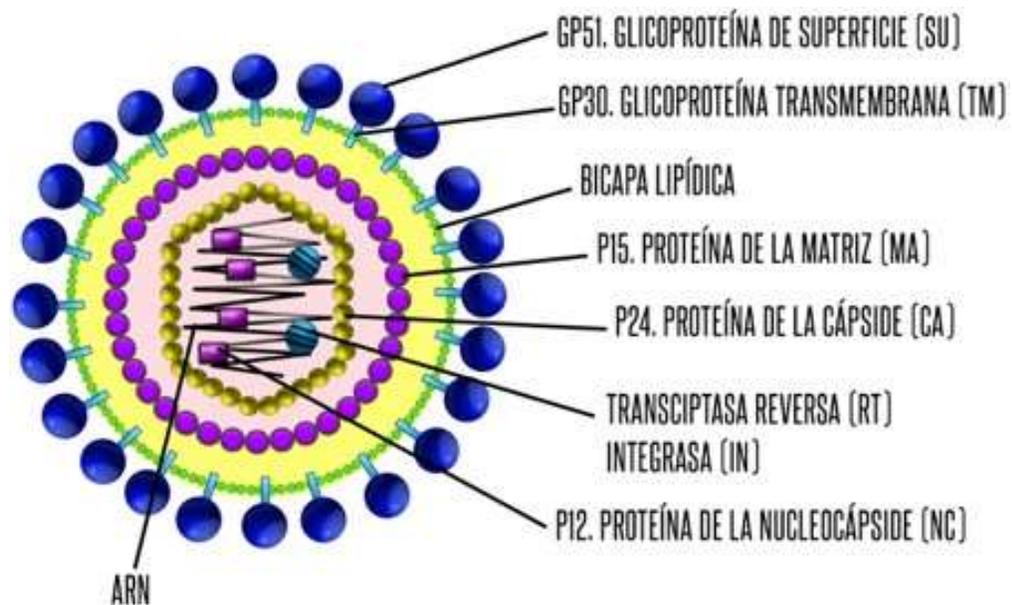


Figura 1 Esquema representativo de una partícula viral del VLB (adaptado de Gillet y col., 2007). Dos copias de ARN genómico monocatenario se empaquetan en una partícula. Las proteínas CA (p24) forman una cápside que contiene el ARN viral en interacción con la nucleocápside NC (p12). Dos proteínas enzimáticas (RT e IN) necesarias para la transcripción inversa y la integración del genoma viral, respectivamente, también son empaquetado en la cápside. La proteína de matriz MA (p15) interconecta la cápside y la envoltura externa que está formada por una bicapa lipídica de origen celular en la que se inserta un complejo de proteínas virales (gp51 SU y gp30 TM).

4.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

4.1.2.1 Transmisión del agente

La infección con VLB está relacionada directamente con sistemas de manejo intensivo, con el estrecho contacto físico entre los animales y con la importante participación del ser humano (Moratorio, 2012). Generalmente la mayor prevalencia se asocia al ganado lechero, sugiriéndose que las prácticas de manejo juegan un rol preponderante en la transmisión del agente. 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 más posibilidades de infectarse que aquellos criados en sistemas extensivos. En el mismo sentido, Puentes y col. (2016a) demuestran que no sólo la vía de transmisión es importante sino también las condiciones de manejo de los animales, tomando un rol preponderante los campos de recría, donde la transmisión del VLB se vería facilitada.

La transmisión de este virus puede ser tanto horizontal como vertical, siendo la primera responsable de la mayoría de las infecciones en el ganado bovino (85%). Los animales portadores asintomáticos son la principal fuente de infección en los rodeos.

La transmisión horizontal se produce por el traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano, viéndose favorecida por el incremento de la densidad animal (número de animales por metro cuadrado) (Chamizo, 2005). Los linfocitos infectados con el provirus pueden encontrarse en secreciones y excreciones como ser sangre, leche, calostro, secreción nasal, saliva, semen, orina y heces. En particular, la transmisión horizontal iatrogénica a través de procedimientos que permiten la transferencia de sangre entre el ganado es una ruta muy importante de propagación, ya que la mayor proporción de linfocitos infectados se encontrará en la sangre periférica. Esto se ve ilustrado por la utilización de un instrumento común para descornes, vacunaciones, tatuajes o bien palpaciones transrectales sin las medidas asépticas adecuadas (Hopkins y col., 1997).

También se ha demostrado que insectos hematófagos pueden jugar un rol importante en la propagación del VLB, dentro de ellos tábanos y moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*) (Manet y col., 1989). Varios investigadores han establecido el papel de estos insectos en la transmisión del VLB, pero bajo condiciones experimentales (Buxton y col., 1985; Ooshiro y col., 2013). Sin embargo, dado que en estos estudios las moscas de los cuernos fueron alimentadas "*in vitro*" con la sangre recolectada de vacas infectada con el virus, su rol en condiciones naturales de alimentación aún es incierto. Un trabajo realizado por Panei y col., 2019, confirmó la presencia del provirus en moscas de los cuernos mediante PCR y secuenciación, siendo éstas alimentadas con sangre de bovinos positivos al VLB en condiciones de comportamiento natural. Los resultados también confirmaron que la transmisión de virus es un evento posible, al menos experimentalmente. Sin embargo, aún se discute el papel de las moscas de los cuernos como vectores de VLB en sistemas de pastoreo natural.

En el caso de la vía vertical se ha demostrado la transmisión prenatal de VLB en ganado lechero en condiciones de campo, mediante pruebas de terneros recién nacidos antes de la administración de calostro (Hopkins y col., 1997). El contagio prenatal se evidencia por los porcentajes de nacidos serológicamente positivos, que van del 3 al 20% (de la Sota, 2005). Además, se conocen infecciones durante la recría por ingestión de calostro o leche. 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, 2010). De todos modos, la ocurrencia de la enfermedad a través de la vía vertical es inusual (15%), ya que existe competencia con los anticuerpos maternos transmitidos por el calostro.

Por último, estudios demuestran tasas crecientes de infección por VLB con la edad. Típicamente, las tasas de infección son bajas en terneros de menos de 6 meses y aumentan a partir de entonces y durante unos 3 años. Sin embargo, rebaños con mayor prevalencia de linfosarcoma tienden a adquirir la infección por VLB a una edad más temprana (Hopkins y col., 1997).

4.1.2.2 Prevalencia a nivel mundial

La aparición de LBE en el ganado fue reportada por primera vez por Leisering en Prusia Oriental (hoy Alemania), quien describió la presencia de nódulos amarillentos en el bazo agrandado de una vaca leucocítica, en el año 1871. Tres años después, Bollinger describió la leucemia bovina como una entidad clínica bien definida, y en 1876 Siedamgrotzky y Hofmeister registraron los primeros casos de neoplasia linfocítica en bovinos. A pesar de todas estas pruebas, la naturaleza infecciosa del agente etiológico no se descubrió sino muchas décadas después en base a evidencia epidemiológica. Finalmente, el agente se aisló en cultivo en 1969, designándose el Virus de la Leucosis Bovina (Rodríguez y col., 2011).

Actualmente el VLB presenta una amplia distribución e incidencia en todo el mundo, con altas prevalencias en regiones como Estados Unidos, donde causa grandes pérdidas económicas en la producción y exportación. Estudios en 2007 revelaron que el 83,9% de los rebaños lecheros de EE.UU. fueron positivos para VLB (NAHMS-USDA, 2007). Una encuesta más reciente indica que entre 2014 y 2015, el 38,6% de los animales llevados a matadero resultaron positivos al VLB, con infección significativamente más alta en bovinos de leche en comparación con el ganado de carne (Bauermann y col., 2017).

En Europa, países como Francia, Alemania, Suecia, España, Dinamarca, Suiza, Reino Unido, Bélgica y otros, han participado en programas de erradicación del virus, siendo Dinamarca el primer país en hacerlo, implementando sistemas de eliminación de rebaños infectados (Gillet y col., 2007). Otros países como Italia, Polonia y Portugal presentan vastas extensiones de su territorio oficialmente libre del VLB, mientras la infección se restringe a pequeñas áreas (Juliarena y col., 2017).

En el mismo sentido, Australia y Nueva Zelanda han desarrollado métodos de erradicación de la infección por VLB en los rebaños lecheros, comenzando a mediados de los noventa, y siendo hacia el año 2005 más del 98% negativos (Rodríguez y col., 2011).

La situación epidemiológica en Asia es más incierta. La OIE reconoce que VLB está presente en Indonesia, Taipei (China) y Mongolia. Sorprendentemente, solo alrededor del 5% de los animales fueron positivos para VLB en Camboya y Taiwán. Las tasas de seroprevalencia en Japón fueron de 68,1% a nivel rebaño (Rodríguez y col., 2011).

Con respecto a los países del Medio Oriente, los informes indican que la prevalencia de la infección por VLB es algo más baja que en otras regiones del mundo, es decir, alrededor del 20%, con excepción de Turquía e Irán, donde los niveles de seroprevalencia del rebaño suben a 48.3% y 64.7%, respectivamente (Rodríguez y col., 2011).

4.1.2.3 Prevalencia a nivel regional

La introducción del virus en América del sur posiblemente haya ocurrido mediante la importación de bovinos infectados provenientes de Europa y Estados Unidos (Carvalho y col., 1998). Se han reportado niveles de prevalencia predial que rondan entre un 34-50% en Venezuela, Chile y Colombia, mientras que en Brasil alcanza niveles por encima de 50% (Rodríguez y col., 2011). Particularmente en Chile la prevalencia encontrada por Grau y col. (2010) fue de 34,7%, menor que en otros países de la región con sistemas productivos similares. Según un estudio publicado por Corredor-Figueroa y col. (2020) en Colombia la prevalencia observada fue de 62% por animal y 92% por granja. La introducción de la infección por VLB en rodeos lecheros en Brasil se vincula a la importación de ganado de cría de alto valor desde Estados Unidos y Canadá, seguido por la introducción masiva de animales desde Uruguay durante los años 70. En un estudio, Flores y col. (1992) mostraron que el

índice de animales positivos importados de Uruguay sin duda contribuyó de manera significativa a la difusión de VLB en este país.

Por su parte, según estudios de Trono y col. (2001), Argentina presentaba una seroprevalencia del 84% en sus rebaños lecheros. Barrios y col. (2012) encontraron que más del 99% de los tambos en las provincias de Córdoba y Santa Fé, así como el norte de la Provincia de Buenos Aires y Sudoeste de la Provincia de Santiago del Estero, estaban infectados. Datos más recientes de establecimientos en estas provincias obtenidos por el Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) muestran que, en promedio, más del 80% de los animales en producción están infectados (Gutierrez y col., 2020).

4.1.2.4 Prevalencia en Uruguay

Las primeras evidencias de la enfermedad en Uruguay fueron presentadas en la década del 60 por Quiñones y Casas (1963). En un trabajo realizado en 1996 en el Noreste del Uruguay, donde se muestrearon 30 predios y se analizaron 400 animales por la técnica de ELISA, la prevalencia de LBE fue de 20%, presentando el 77% de los predios algún caso positivo al virus (Mederos e Irigoyen, 1998). En el año 2003, la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los Departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77%, 72% y 57%, respectivamente (Zaffaroni y col., 2007). En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en los años 2013-2014, la prevalencia de anticuerpos contra VLB al ingreso de un grupo de animales en un sistema de cría de ganado lechero provenientes de 29 productores del sur de Uruguay, fue de 45% (Puentes y col., 2016a), destacándose en este caso que se trataba de terneras de 8 meses de edad.

En 2015, en el marco de un muestreo serológico aleatorio financiado por ANII para determinar la prevalencia de distintas enfermedades que afectan los bovinos, la seroprevalencia para LBE fue de 65 % en tambos con 1 a 50 vacas, 77 % en tambos con 50 a 250 vacas, y del 82 % en tambos con más de 250 vacas, con una prevalencia media de 78,8 % (Riet Correa y col., 2019).

Se sugiere entonces que la falta de programas de control de esta enfermedad, así como la exigencia de libre de LBE para la exportación animal, llevó a un aumento de su prevalencia en nuestro país (Rama y col., 2010).

4.1.3 PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El VLB infecta células de la serie mononuclear, preferentemente linfocitos B CD5+, pero también se ha detectado en menor grado la presencia de ARN mensajero viral en monocitos, granulocitos y linfocitos T CD8+. La estrategia replicativa de este virus, al igual que otros retrovirus, consiste en dos etapas, una temprana dependiente de proteínas virales, y una tardía dependiente de enzimas del hospedero y de los productos de la expresión de genes virales (Moratorio, 2012).

En primer lugar, se reconoce específicamente receptores de la célula hospedera por parte de proteínas de la envoltura viral, lo cual permite la fusión de membranas (Brasseur y col., 1988). Una vez en el citoplasma de la célula, ocurre la etapa de desnudamiento, seguida de la síntesis de ADN a partir del ARN viral, gracias a la acción de la enzima transcriptasa inversa. La nueva molécula de ADN penetra en el núcleo celular y mediante la acción de la enzima integrasa, se integra al azar en el genoma en forma de provirus (Luciw y col., 1992). La integración viral marca el fin de la etapa temprana y el comienzo de la etapa tardía del

ciclo replicativo, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN viral, proteínas y ensamblaje de la progenie (Moratorio, 2012).

Tras la infección, expresión génica y producción de viriones maduros en la célula hospedera, se puede identificar una viremia pasajera que dura entre 10-12 días post-infección (Schwartz y col., 1994b). Una vez que se obtiene la respuesta inmune específica celular y humoral, se produce un agotamiento masivo de estos clones iniciales, y la carga proviral disminuye significativamente. La propagación posterior de la infección se produce a través de la expansión clonal de las células huésped infectadas, sin evidencia de transcripción inversa (Juliarena y col., 2017). Es decir, la replicación eficaz del virus y la infección de nuevas células diana parecen ocurrir principalmente, sino casi exclusivamente, durante un período muy corto tras la infección primaria. Sin embargo, todavía es posible que el ciclo replicativo continúe de manera sostenida, pero el resultado neto de este proceso no contribuya de manera significativa a la carga viral observada, debido a una respuesta inmune eficiente (Gillet y col., 2007).

A lo largo de la evolución, la relación entre el VLB y su hospedero natural, el bovino, se ha encaminado hacia una mínima patogenicidad, lo que resulta en que la mayoría de los animales infectados por este virus sean asintomáticos. Es así que, la infección por VLB se ajusta al concepto de “iceberg” típico de muchas enfermedades virales, siendo aproximadamente el 70% de los infectados, asintomáticos (Juliarena y col., 2017). Esta fase inaparente de la infección se caracteriza por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados, y la consecuente producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales, principalmente la glicoproteína gp51 de la envoltura. Se trata de una infección persistente, pero asintomática y aleucémica (Barez y col., 2015).

Mientras tanto, un tercio del ganado infectado desarrollará un aumento permanente y relativamente estable en el número de linfocitos B en su sangre periférica, lo que se conoce como Linfocitosis Persistente o LP (Juliarena y col., 2017). Este estadio, de carácter benigno (Carvalho y col., 1998), es el resultado de la interrupción en la homeostasis de las células B, que representa un equilibrio complejo entre la tasa de proliferación y apoptosis de las mismas (Juliarena y col., 2017). Se trata de animales clínicamente normales (portadores asintomáticos), que presentan una expansión de la población de linfocitos B, a causa de una disminución en la tasa de recambio de estos (Baruta y col., 2011) y a la resistencia a la apoptosis (Chamizo, 2005). Como consecuencia, esto se traduce en una acumulación de células B infectadas en la sangre (Juliarena y col., 2017). Se define linfocitosis persistente como un aumento en el recuento de linfocitos superior a 3 desvíos estándar sobre la media (Marshak, 1968) que se mantiene en 2 muestras analizadas, separadas en el tiempo por un período de 60 a 90 días (Bendixen, 1963).

La aparición de la “punta del iceberg”, es decir, la enfermedad tumoral propiamente dicha, ocurrirá en un 1-5% de los animales infectados, tras un largo período de latencia que va de 1 a 8 años (Juliarena y col., 2017). La condición patológica, que puede o no manifestar expansión policlonal de linfocitos B, sí resulta de la transformación neoplásica de células B en uno o más órganos. Las lesiones del linfosarcoma aparecen como masas tumorales blancas y firmes, o como un infiltrado tisular difuso, con mayor frecuencia en abomaso, corazón, ganglios linfáticos viscerales y periféricos, bazo, útero y riñones (Chamizo, 2005). Las lesiones podrán determinar una serie de trastornos funcionales de origen mecánico como compromiso de los bronquios con disnea, compresión del nervio vago, del esófago produciendo meteorismo crónico, del corazón con edemas e hidropesías del timo, de médula espinal con parálisis posterior, o bien de los ojos produciendo exoftalmia. Dentro de los

posibles signos clínicos, se puede observar astenia, adelgazamiento, disminución del apetito, fatiga, disminución del rendimiento lácteo, anemia. Las adenopatías o tumefacciones ganglionares constituyen el signo característico, no siempre simétricas ni generalizadas (de la Sota, 2004). En última instancia, el desarrollo de estos tumores conduce a una serie de defectos no compatibles con la vida, desarrollándose signos clínicos que dependerán de la ubicación de los tumores (Radostits, 2007).

4.1.3.1 Fenotipos con alta y baja carga proviral

Los animales infectados con VLB que son hematológicamente normales (es decir, aquellos que no desarrollan LP o linfosarcoma), comprenden dos grupos que pueden diferenciarse en términos de su carga proviral en sangre periférica y títulos de anticuerpos contra los antígenos principales del virus. En efecto, tras la infección algunos bovinos desarrollan una alta carga proviral integrada a su genoma (>100.000 copias provirales de VLB/ μ g de ADN) y títulos altos de anticuerpos contra la proteína más antigénica del VLB, es decir, gp51. En tanto, otro grupo de animales desarrolla una carga proviral muy baja en sangre periférica luego de la infección con VLB, y una respuesta inmune humoral también baja. Este ganado generalmente alberga <100 copias provirales de VLB / μ g de ADN en su sangre periférica, lo cual a menudo es indetectable por métodos moleculares utilizados habitualmente (PCR y PCR a tiempo real) (Juliarena y col., 2007). Estos fenotipos de infección por VLB con baja o alta carga proviral se encuentran asociados al polimorfismo del gen MHCII BoLA-DRB-3 (Gutierrez y col., 2017).

Poder caracterizar a los animales según su fenotipo puede ser de gran importancia al momento de implementar programas de erradicación. Animales con baja carga proviral podrían ser seleccionados para disminuir la presencia del virus (Juliarena y col., 2007), aunque el inconveniente en este tipo de manejo sería la limitación de la selección de los animales para otras características fenotípicas de interés productivo distinto. Particularmente, Juliarena y col. (2016) desarrollaron un experimento en el que se probó que los bovinos heterocigotos LPL-BoLA-DRB3*0902 (es decir, aquellos con bajas cargas provirales), al ser incorporados en un rebaño lechero negativo al VLB, interrumpieron la cadena de transmisión del virus durante el período de estudio. En el mismo sentido, Ruggiero y col. (2019) realizaron un ensayo a campo para estudiar la transmisión del VLB en rodeos lecheros, utilizando medidas de la carga proviral y recuento de linfocitos como indicadores de los animales más infecciosos. Los animales con alta carga proviral y altos recuentos de linfocitos fueron periódicamente segregados a medida que se los identificaba, y luego de 2 a 2,5 años de realizado el manejo, el riesgo de incidencia de nuevas infecciones disminuyó de 13,8 a 2,2, y la prevalencia general del rebaño disminuyó del 62,0 al 20,7%. Esto sugiere que dicho enfoque puede reducir la transmisión y la prevalencia de VLB. Esto se consideró alentador, ya que una vez logradas prevalencias muy bajas de la infección por VLB, sería económicamente factible sacrificar el ganado restante positivo para ELISA, como se ha logrado en programas nacionales de erradicación en algunos países.

4.1.4 DIAGNÓSTICO

Los animales que presentan linfoma pueden ser detectados mediante diagnóstico clínico/paraclínico (biopsia y/o necropsia), pero aquellos infectados asintomáticos o con LP requieren de pruebas de laboratorio para detectar la infección. Las mismas pueden ser

directas, si identifican al agente etiológico, o pruebas serológicas que buscan evidenciar la respuesta inmune a la infección por el virus.

Como método diagnóstico directo el virus puede ser detectado en el sobrenadante del cultivo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (OIE, 2019), o mediante pruebas de detección de antígeno como la PCR, que detecta secuencias del gen Env codificante de la proteína gp51 del VLB (Ballagi-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006). La detección serológica de anticuerpos principalmente contra gp51 de la envoltura viral, se puede realizar mediante las técnicas de IDGA en suero, o por ELISA en suero o leche (OIE, 2019), técnicas que son comúnmente utilizadas para la identificación de animales infectados. Estas técnicas son reconocidas por la OIE y aceptadas por la mayoría de las autoridades gubernamentales, incluido nuestro país, como pruebas oficiales para el diagnóstico del VLB (Rama y col., 2010).

La infección del ganado por el virus dura toda la vida y origina una respuesta persistente de anticuerpos, los cuales se detectan por primera vez a las 3–16 semanas post-infección. Los anticuerpos derivados de la madre pueden tardar de 6 a 7 meses en desaparecer, mientras que los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra la gp51 y la p24 del virus (OIE, 2019).

En un estudio comparativo de las pruebas IDGA, ELISA y PCR, realizado en Uruguay por Rama y col. (2010), se concluyó que la IDGA fue el método que detectó menor número de animales positivos y la PCR el método más sensible, coincidiendo con trabajos previos (Fechne y col., 1997; Martín y col., 2001; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007). Por su parte, si bien la sensibilidad de la IDGA y el ELISA fue menor que la de la PCR, la especificidad de ambos métodos fue mayor. De este modo, la PCR se considera el método más efectivo, ya que es capaz de detectar el provirus en animales serológicamente negativos por inmunotolerancia, con infecciones recientes que no hayan desarrollado respuesta inmunológica (virus latente, animal con baja carga proviral o terneros jóvenes que consumieron calostro de madres positivas), o bien en casos que presenten tumores y se quiera diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso (Rama y col., 2010).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas para la cuantificación de la carga proviral en células de animales infectados utilizando *Real time* PCR (qPCR) (Rola-Łuszczak y col., 2013). Particularmente, Petersen y col. (2018) desarrollaron una PCR a tiempo real utilizando SYBR Green, con el fin de que sea económicamente accesible. La técnica permitió una detección y cuantificación altamente sensible y específica de ADN proviral del VLB en leucocitos de sangre periférica purificados y en una matriz de leche. Estos métodos representan gran utilidad al momento de asociar la relación existente entre la cantidad de provirus y el efecto negativo sobre la transmisión del VLB.

4.1.5 RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

La transmisión natural o iatrogénica del VLB implica la transferencia de células infectadas, principalmente a través de la sangre. Si bien los procesos que ocurren luego de esta infección primaria no han sido completamente dilucidados, se sabe que una de las primeras respuestas generadas es la antiviral humoral, aproximadamente 1-8 semanas post-inoculación. Los anticuerpos reconocen epítopes de proteínas estructurales (de la envoltura, gp51, y de la cápside, p24) y reguladoras (Tax y Rex), siendo algunos de ellos con efecto lítico sobre las células productoras de virus. Desde el punto de vista inmunológico, la enfermedad por VLB

se va a poder dividir en tres estadios: animales serológicamente positivos pero negativos a linfocitosis, serológicamente positivos con linfocitosis persistente (LP), y animales con leucemia (Kabeya y col., 2001).

Como otros retrovirus causantes de infecciones crónicas, el VLB desarrolla un período asintomático prolongado (de 1 a 8 años), con bajas cargas provirales. El 30% de los animales infectados progresará a LP, que se caracteriza por una expansión policlonal de células B, y sólo entre el 0,1-10% desarrollará linfosarcoma maligno. Por lo general, se requiere una larga duración entre estas etapas de la enfermedad, lo que sugiere que el VLB modula el sistema inmune del hospedero. En tal sentido, a pesar de generar una respuesta antiviral fuerte, el virus persiste indefinidamente a lo largo de la vida del animal, aparentemente en un estado de transcripción silenciado, por lo menos en una proporción de células infectadas (Florins y col., 2007). De todos modos, la actividad antiviral persiste durante toda la vida de los animales, lo que indica que el sistema inmune es estimulado permanentemente por los antígenos del VLB (Juliarena y col., 2017).

Casi concomitantemente con el período de seroconversión temprano, los linfocitos T citotóxicos específicos para los epítomos Tax y Env aparecen en sangre periférica (Gillet y col., 2007). En comparación con los humanos, una peculiaridad del ganado bovino es que los linfocitos T gammadelta son los principales actores en esta respuesta citotóxica (Lundberg y col., 2000). Los animales VLB positivos (VLB+) en las primeras etapas de la infección desarrollan una respuesta celular mediada principalmente por linfocitos T helper 1 (Th1) que producen IL-2, IL-12 e IFN- γ . La progresión de la enfermedad, junto con la linfocitosis persistente, produce cambios en el perfil de las células T hacia una respuesta T helper 2 (Th2) (Kabeya y col., 2001). En esta fase, hay un aumento dramático en las poblaciones de linfocitos B y una disminución en los porcentajes de linfocitos T CD4+ y T CD8+ (Sordillo y col., 1994).

La infección por VLB reduce la expresión de citoquinas de tipo 1 de los linfocitos T CD4+ y los perfiles de citoquinas de todas las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que las citoquinas de tipo I y II se alteran, con aumentos de interleuquina 10 (IL10) e interleuquina 4 (IL4) y disminuciones de interleuquina 2 (IL2), interleuquina 12 (IL12) e interferón γ (IFN γ) (Puentes y col., 2016b). También se sabe que la progresión de VLB interrumpe la homeostasis de la proliferación de linfocitos y la muerte celular, tanto en células B como en células T.

Más recientemente, Nieto y col. (2018) estudiaron los disturbios inmunológicos causados por el VLB a nivel del perfil de células T, claves en la regulación del sistema inmune en infecciones naturales y en la respuesta a la vacunación. En este sentido, encontraron que el porcentaje de células era significativamente menor en animales con alta carga proviral, estando afectados tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+, asociándose el cambio en la proporción de estas células con la desregulación en la secreción diferencial de citoquinas. En correspondencia con esto, también existen estudios que relacionan positivamente la carga proviral con la producción de receptores inmunoinhibitorios de las células T infectadas, lo que favorece la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune, mediante el aumento en la expresión de IL-10 y la disminución de INF γ (Bartlett y col., 2014).

4.1.6 TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCIÓN

Una de las características más importantes de la infección por el VLB es que el virus se mantiene en estado silencioso dentro de las células infectadas, y de esta manera, el sistema inmune no lo puede detectar. Se ha puesto mucho esfuerzo en la identificación de compuestos capaces de revertir la latencia del VLB para permitir que las células infectadas sean susceptibles al accionar inmunitario (Juliarena y col., 2017), sin resultados satisfactorios hasta el momento.

Del mismo modo, pese a los avances en la investigación con vacunas experimentales, no existen todavía vacunas comercializadas para el control de la LBE (OIE, 2019). Las primeras vacunas de subunidades virales fueron desarrolladas a partir de glicoproteína de superficie gp51. Estas vacunas eran inmunogénicas, sin embargo, no protegían contra el desafío con el virus (Onuma y col., 1984; Kabeya y col., 1996). Se han evaluado vacunas inactivadas obtenidas a partir de células persistentemente infectadas, pero estas inducían una fuerte respuesta humoral neutralizante y protegían parcialmente a ovinos y bovinos de un desafío a bajas dosis, sin embargo, estos se infectaban en desafíos a dosis altas (Miller y Vaan der Maaten, 1978; Fukuyama y col., 1993). También se han hecho estudios con lisados de células infectadas, a partir de membrana plasmática o células extraídas de tumores (Ristau y col., 1987), pero a pesar de otorgar protección parcial, esta estrategia implica un riesgo intrínseco de transmisión de enfermedades (Rodríguez y col., 2011). Por último, se han intentado producir vacunas recombinantes, utilizando péptidos sintéticos de gp51 y vacunas de DNA, pero no han sido eficientes en bovinos u ovinos (Burny, 1996). En los últimos años se ha proclamado el éxito en el desarrollo de una vacuna que utiliza un provirus con múltiples modificaciones genéticas (Rodríguez y col., 2011; Gutierrez y col., 2014a; Abdala y col., 2019). Sin embargo, no existe información sobre las características de este provirus mutado, de la protección inmunitaria conferida a largo plazo a los animales vacunados, de la evaluación de seguridad de la vacuna, ni tampoco de la estrategia a ser utilizada para diferenciar animales vacunados de animales infectados. La nueva evidencia científica sobre la biología del virus y sobre la alteración en la función de genes represores de tumores que representa la incorporación de retrovirus en el genoma del hospedador, enfatiza aún más la necesidad de precaución al momento de utilizar vacunas retrovirales vivas atenuadas (Gutierrez y col., 2020). En conclusión, hasta la fecha, ninguna vacuna contra el VLB ha tenido éxito, y una vacuna preventiva adecuada podría tomar muchos años en materializarse. Por todo lo antes expuesto, el control de la LBE se basa en su diagnóstico mediante pruebas serológicas y la implementación de una serie de manejos específicos. La elección de una estrategia de control dependerá principalmente de la prevalencia de la infección en el rebaño, el valor de los animales y la posibilidad de recibir indemnizaciones gubernamentales a los productores por el sacrificio de bovinos seropositivos (Juliarena, 2017), sumado a los costos económicos y las restricciones de gestión (Rodríguez y col., 2011).

Podemos identificar las siguientes estrategias básicas para el control de la infección por VLB:

1. Test para la identificación de animales positivos y sacrificio: la eficacia de esta estrategia se ilustra con la erradicación exitosa de la LBE en varios países de Europa, pero a pesar de ello su viabilidad enfrenta algunas restricciones importantes. El costo económico de esta estrategia irá de la mano con la tasa de prevalencia inicial de la infección, el valor de los animales, y su potencial genético y reproductivo. Este tipo de programa implica políticas de compensación económicas para los productores, lo cual contribuye a la falta de adherencia y falla de los mismos (Rodríguez y col., 2011).

2. Test para la identificación de animales positivos y segregación: este enfoque tiene como objetivo reducir parte de los costos, segregando a los animales positivos en lugar de sacrificarlos. Tras la detección de los bovinos positivos, estos deben permanecer en áreas estrictamente separadas de los seronegativos. Se ha propuesto que se debe respetar una distancia mínima de 200 metros para evitar la transmisión (Shettigara y col., 1989). Para poder obtener resultados óptimos con esta estrategia, se debe implementar un equipo separado o al menos una desinfección cuidadosa e higiene del material no desechable. La principal ventaja radica en la reducción de pérdidas costosas por sacrificio prematuro obligatorio y reemplazos. Aunque es bastante exigente, este tipo de programa ha sido útil para disminuir la prevalencia e incluso lograr la erradicación de la LBE (Rodríguez y col., 2011). Su desventaja principal es que existe un riesgo permanente de reintroducir animales infectados, y es un programa a largo plazo.
3. Monitoreo e implementación de medidas de manejo correctivas: este tipo de enfoque tiene como objetivo limitar la transferencia de células infectadas por VLB presentes en sangre, leche, secreciones, excreciones, jeringas o instrumental quirúrgico (Rodríguez y col., 2011). Dentro de algunas medidas se puede mencionar: uso de agujas y jeringas individuales de un solo uso durante la vacunación o protocolos terapéuticos; uso de mangas obstétricas individuales de un solo uso; limpieza, desinfección o esterilización de instrumental quirúrgico en procedimientos tales como descornado, tatuajes, castración o marcado de orejas; alimentación de terneros con calostro o leche entera de madres seronegativas, calostro pasteurizado en el caso de madres seropositivas, así como reemplazo por sustituto de leche; control de población de moscas hematófagas, particularmente en áreas de ordeño durante el verano; inseminación natural y artificial con toros libres de VLB; reposiciones solamente con bovinos negativos; diagnóstico periódico de todos los animales, ya sea semestral o anualmente (Silvera y Fraga, 2019). Comparado con las estrategias anteriores, esta no requiere realizar mayores inversiones o eliminación de animales. Las principales desventajas de este programa es el cambio de rutina en el establecimiento, entrenamiento del personal, estar sujeto al factor humano y la existencia de otras fuentes de infección como los insectos hematófagos. En este tipo de estrategias, es posible que los resultados no sean evidentes hasta luego de varios años (Puentes, 2016c).
4. Selección genética de ganado resistente al VLB: la respuesta inmune y la resistencia hereditaria o susceptibilidad a la infección por el VLB están influenciadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del hospedero (Bacon, 1987) que en bovinos se refiere al gen Antígeno Linfocitario Bovino (BoLA). La resistencia genética a la infección por VLB parece ser un mecanismo complejo controlado por múltiples genes, cada uno de los cuales contribuye sutilmente al fenotipo. La presencia de un alelo en particular del gen MHCII BoLA-DRB-3 se correlaciona con un perfil de baja carga proviral (alelo 0902), por lo cual se propuso que el ganado que lo alberga podría no ser capaz de transmitir el VLB (Rodríguez y col., 2011). Los polimorfismos en los genes BoLA-DRB3 también se correlacionaron con la resistencia y la susceptibilidad de los animales a desarrollar leucemia/linfoma. La limitante de la implementación de este tipo de manejo es principalmente la selección de los animales por otras características genéticas o fenotípicas que son de interés productivo distinto. Además, se requiere de análisis a nivel de población a gran

escala, para poder evaluar la eficiencia de la selección basada en los rasgos genéticos particulares. Por último, la selección genética puede provocar una pérdida de biodiversidad en la población bovina, particularmente importante en la resistencia a otros patógenos (Rodríguez y col., 2011).

En Uruguay, el Decreto 165/2007 expresa el apoyo del Estado respecto a la disponibilidad de una política de control de la LBE. Sin embargo, la creciente prevalencia de la enfermedad deja en evidencia que la implementación de medidas clásicas para el control de la infección, aunque efectivas, no fueron y no son sustentables y económicamente factibles para la mayoría de los productores lecheros (Silvera y Fraga, 2019).

4.1.7 IMPACTO

El impacto sanitario y económico de esta enfermedad crónica, que como ya fue mencionado, en su mayoría se presenta de modo asintomático, puede ser directo por la mortalidad de animales con la presentación tumoral (linfosarcoma), eliminación prematura de los animales infectados, o bien por la barrera comercial representada en las restricciones para la exportación de ganado en pie, semen y embriones. Pero el mayor impacto del VLB es indirecto, por la disminución de índices productivos y reproductivos, así como por la alteración del sistema inmune en animales seropositivos.

Trabajos recientes indican un efecto negativo en la producción y calidad de la leche debido a la infección. A nivel de rodeo se encontró una asociación lineal entre la mayor prevalencia de infección por VLB y una menor producción de leche (Ott y col., 2003; Erskine y col., 2012;). A nivel individual, se observó que la infección por VLB disminuye la producción de leche en 1.5%/vaca/año (Norby y col., 2016), estimándose una pérdida de 11.000 kg/animal en su vida productiva (Nekouei y col., 2016). La infección por VLB también se ha asociado con un aumento en el recuento de células somáticas (RCS) en leche, lo cual sucede especialmente en vacas con más de cuatro lactancias (Yang y col., 2016). El aumento en el RCS es un indicador de mastitis clínica y subclínica y, por ende, está asociado a una menor producción láctea, a leche con mayor carga bacteriana y menor porcentaje de grasa y caseína, a una menor producción y calidad de quesos, y a un menor tiempo de conservación de los productos lácteos (Gutierrez y col., 2020).

Es importante mencionar además que se ha planteado la influencia de la presencia del virus en la longevidad de los animales, de modo tal que vacas con mayores títulos de anticuerpos contra VLB tienen un 40% más de probabilidad de ser refugadas (Bartlett y col., 2013). Debido a esta influencia negativa del VLB sobre la longevidad, los rebaños lecheros con una alta prevalencia de la infección tienden a presentar una edad media más baja, lo cual también tiene su impacto sobre la producción láctea, ya que, comparado con las vacas más jóvenes, las de mayor edad tienden a producir más leche, y son las que tienen más probabilidad de estar infectadas con el virus (Bartlett y col., 2014).

Por otro lado, a nivel reproductivo la infección con VLB se ha asociado a un aumento del intervalo entre partos y mayor número de servicios por concepción, sugiriendo que el virus podría tener influencia en el comportamiento reproductivo del ganado lechero (Vanleeuwen y col., 2010; Romero y col., 2015). VanLeeuwen y col. (2010) informaron que las vacas VLB seropositivas tuvieron una tasa de concepción 7% más baja en comparación con las vacas seronegativas. Según un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (Puentes y col.,

2016a), la tasa de concepción en animales seropositivos fue 26% más baja que en vaquillonas seronegativas del mismo período reproductivo.

Por su parte, el efecto inmunológico más obvio de la infección por VLB es la linfocitosis en sangre periférica, que puede ser indicativa del inicio de una función inmunitaria alterada. Resultados de múltiples estudios indican que la infección por VLB degrada la función linfocitaria en el ganado, lo cual disminuye la respuesta inmune a las vacunas y a las infecciones oportunistas (Barlett y col., 2014). El VLB puede afectar las células del sistema inmune en muchos niveles, especialmente en la proliferación, apoptosis y expresión de receptores y citoquinas (Kabeya y col., 2001; Frie y Coussens, 2015; Iwan y col., 2017). Se ha propuesto que la infección con este virus predispone o disminuye la resistencia a la infección contra otros patógenos. Frie y col. (2017) hallaron que las vacas infectadas con VLB presentan títulos significativamente más bajos de anticuerpos específicos de antígeno en comparación con las vacas no infectadas. Asimismo, se ha observado una respuesta serológica disminuida frente a la vacunación contra varios patógenos en animales positivos a VLB, sugiriendo una menor protección vacunal en las vacas infectadas (Erskine y col., 2011; Frie y Coussens, 2015; Frie y col., 2016; Puentes y col., 2016b).

Por último, se han realizado diversos estudios para determinar si el VLB causa enfermedades en los humanos, sobre todo asociado al consumo de leche de vacas infectadas. Del mismo modo, se ha especulado acerca de la participación del virus en el cáncer de mama humano asociado al consumo de leche (Giovanna y col., 2013; Buehring y col., 2015; Buehring y col., 2017), pero estos hallazgos aún no han sido confirmados. Así pues, dado que todavía no existen datos concluyentes en relación con una transmisión zoonótica, actualmente se considera que el VLB no es peligroso para el ser humano (OIE, 2019).

4.2 RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA

4.2.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El Herpesvirus Bovino tipo I (BoHV-1) es un miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Roizman, 1982), género *Varicellovirus* (Brown, 1989), que basado en patrones de restricción de enzimas se clasifica en tres subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a y BoHV-1.2b, subdivisión que cobra importancia ya que cada uno de estos subtipos está asociado a diferentes manifestaciones clínicas (Engels y col. 1996; d'Offay y col., 2016). Afecta de manera natural a bovinos de todas las edades, produciendo pérdidas económicas en términos de mortalidad, morbilidad y complicaciones con otras patologías infecciosas. Es considerado uno de los patógenos virales más importantes para el ganado bovino, y la principal causa de abortos de etiología viral en el mundo (Muylkens y col., 2007). Por lo tanto, su principal impacto lo encontraremos en los disturbios reproductivos que genera, destacándose entre ellos la mortalidad embrionaria, repetición de celos a intervalos irregulares, mortalidad fetal y aborto, además de infecciones genitales que culminan en vulvovaginitis y cervicitis (Barbosa y col., 2019).

Se trata de un virus ADN lineal doble cadena, con cápside icosaédrica y un envoltorio derivado de las células hospederas, que contiene proteínas de membrana codificadas por virus. Su ciclo replicativo es relativamente corto, se disemina rápidamente en cultivos

celulares y presenta alta citopatogenicidad, siendo una característica destacable el desarrollo de latencia en el organismo hospedador (Romera, 2001), a nivel de ganglios nerviosos sensoriales y durante toda la vida del animal (Muylkens y col., 2007).

El BoHV-1 causa un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde rinitis (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) en hembras y balanopostitis pustular infecciosa (IPB) en machos. Los subtipos 1.1 y 1.2a clínicamente pueden cursar con síntomas respiratorios (IBR), conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos. Por su parte, el BoHV-1.2b, está asociado a la enfermedad genital (IPV/IPB) y no se encuentra asociado a abortos (Metzler y col., 1985; Miller y col., 1991).

Mientras las infecciones genitales son de naturaleza local y se caracterizan por no dejar secuelas, la infección del tracto respiratorio puede asociarse a conjuntivitis y secundariamente a abortos, infertilidad y en casos raros enteritis (Romera, 2001), que responden a una viremia inicial y pasaje del virus hacia la sangre (Repiso y col., 2005). Si bien el patógeno es importante dentro del complejo de enfermedades respiratorias del bovino, sus implicancias más destacadas para la producción son a nivel reproductivo (Newcomer y col., 2017a).

La forma respiratoria se caracteriza por obstrucción de las vías aéreas superiores, con descarga nasal mucosa a muco-purulenta, mucosa nasal hiperémica con lesiones necróticas a nivel de morro y narinas, y conjuntivitis. Generalmente esta forma es acompañada por signos generales de fiebre, depresión, inapetencia, aborto y reducción de la producción de leche (Repiso y col., 2005). Los casos de aborto por IBR son, por lo tanto, secuelas de la forma respiratoria y generalmente se presentan luego de una primoinfección con o sin sintomatología aparente. Clásicamente el BoHV-1 se considera un causante de abortos tardíos, ocurriendo en su mayoría luego de los siete meses de gestación. Por lo general, el aborto ocurre a las pocas semanas de la exposición viral, pero puede demorarse hasta tres o cuatro meses después de la exposición si ocurre latencia viral en la placenta (Radostits y col., 2007).

Las infecciones genitales (IPV y IPB) por su parte, son caracterizadas por lesiones necróticas de leves a severas de la mucosa vaginal o prepucial, con formación de pústulas redondeadas que evolucionan favorablemente en la mayoría de los casos, en 10 a 15 días (Repiso y col., 2005).

4.2.2 EPIDEMIOLOGÍA

4.2.2.1 Transmisión y patogenia

La infección natural ocurre por contacto del virus con membranas mucosas del tracto respiratorio superior y genital (Muylkens y col., 2007). Gran cantidad de virus se disemina principalmente por secreciones respiratorias, oculares y genitales de animales infectados (Wyler y col., 1989). La entrada del virus en el tracto respiratorio ocurre generalmente por aerosol o por contacto directo con virus presente en secreciones nasales. En contraste, la transmisión genital ocurre solo por contacto directo o a través de semen infectado, lo cual tiene particular importancia en procedimientos de inseminación artificial, donde debe procurarse la seronegatividad en toros utilizados para tales fines (Tikoo y col., 1995).

Desde el punto de vista patogénico, la infección por BoHV-1 pasa por tres fases: una infección primaria que puede durar aproximadamente 2 semanas, seguido de una fase de latencia que puede durar por el resto de la vida del animal infectado y una tercera fase de reactivación de los virus en latencia y liberación de estos por el huésped (Muylkens y col., 2007; Silvestro y Bratanich, 2016) hecho que cobra particular importancia en la transmisión y mantenimiento de la infección en el rodeo. La reactivación del virus y su excreción puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos naturales o artificiales tales como estrés, parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticoides, infección con otros virus o microorganismos, radiación ultravioleta, entre otros (Tikoo y col., 1995). Por su parte, los tejidos de preferencia de BoHV-1 para producir latencia son los ganglios sensoriales de los nervios asociados al sitio de entrada en la primo infección del patógeno. Por ejemplo, ganglio Lumbosacro en infecciones vía genital y en ganglio Trigémico en infecciones de origen respiratorio (Furtado, 2016).

4.2.2.2 Prevalencia

La OIE reconoce a IBR/IPV en la lista B de enfermedades notificables. Dicha lista incluye a las enfermedades transmisibles que son de importancia socioeconómica y/o para la Salud Pública y que tienen significado para el comercio internacional (Biswas y col., 2013; OIE, 2019).

En Europa, las infecciones causadas por BoHV-1 presentan prevalencia que varía desde 35 a 54%. Países como Dinamarca, Suiza, Finlandia y Austria han conseguido eliminar el virus a través de identificación de seropositivos y eliminación del rebaño (Furtado, 2016).

En América del Norte la infección tiene carácter endémico, con índices de prevalencia elevados que varían entre 36 y 83% (Furtado 2016).

Con respecto a América del Sur, países como Argentina, Colombia y Brasil han demostrado el carácter endémico de BoHV-1, variando la prevalencia entre 8.8 y 84.1% (Furtado, 2016).

En Uruguay este patógeno fue aislado por primera vez en el año 1981, a partir de un bovino seropositivo, utilizando el protocolo de inmunosupresión artificial con corticoides (Guarino y col., 1982). Posteriormente se describió un caso de granuloma nasal en bovinos, en el cual también se aisló el herpesvirus (Rivero y col. 1987). En el año 1999, el subtipo 1.1 (BoHV-1.1) fue aislado de un ternero con sintomatología nerviosa (Alonzo y col., 2002). Luego, en los años 2002 y 2004 otras dos cepas de BoHV-1 fueron aisladas y caracterizadas como pertenecientes al subtipo 1.2 (Puentes y col., 2007). Desde el punto de vista epidemiológico, en Uruguay la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida tanto en ganado para carne como lechero (Repiso y col., 2005). La prevalencia serológica de BoHV-1 a nivel nacional se estima en 37%. Sin embargo, del total de establecimientos ganaderos estudiados, en el 99% existían al menos un animal positivo para BoHV-1, demostrando la alta difusión a nivel predial de la enfermedad (Guarino y col., 2008).

4.2.3 DIAGNÓSTICO

Puede sospecharse de infección por el BoHV-1 a partir de hallazgos clínicos, anatomopatológicos y epidemiológicos. No obstante, para llegar a un diagnóstico definitivo, es necesario realizar pruebas de laboratorio. Así, el diagnóstico de la infección por BoHV-1 se basa en la detección de anticuerpos por técnicas serológicas como el ELISA indirecto y la

Seroneutralización *in vitro*; y en métodos directos como el aislamiento del virus en cultivos celulares e identificación del efecto citopático, y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) o moleculares como la PCR, a partir de hisopados nasales o genitales tomados durante la fase aguda de la infección, o bien órganos extraídos post-mortem en casos graves (OIE, 2019). Siendo la infección altamente prevalente en los rodeos lecheros y de cría, un resultado serológico aislado no implica una relación causal en la presentación de la enfermedad, sino que solo determina el contacto del animal con el virus en algún momento de su vida. Para poder llegar a un diagnóstico certero por serología es necesario un estudio de la cinética de anticuerpos con muestras pareadas y/o el aislamiento o detección del virus en los animales afectados (Repiso y col., 2005). Para el aislamiento del virus, se utilizan distintos cultivos celulares de origen bovino, como células pulmonares o renales secundarias o la línea de células renales bovinas Madin-Darby (MDBK). El virus produce un efecto citopático en 2-4 días (OIE, 2019).

También es de destacar que una desventaja de los métodos serológicos para el diagnóstico radica en la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente, cuando se emplean vacunas convencionales como las utilizadas en el Uruguay. Al ser la vacunación un método empleado de forma regular, es difícil en la actualidad conocer la situación real de la enfermedad en nuestro país (Furtado, 2016).

4.2.4 RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR Y VACUNACIÓN

4.2.4.1 Respuesta inmune

Después de la infección primaria, la reacción inflamatoria y celular inespecífica son la primera respuesta a la infección por el BoHV-1. Algunos de los mecanismos inespecíficos son constitutivos, como la activación del complemento, mientras que otros, como el interferón (IFN), son inducidos por la replicación del virus. La producción de citoquinas tempranas conduce al reclutamiento y activación de diferentes células como ser macrófagos, neutrófilos, polimorfonucleares y células Natural Killer (NK). Estos efectores potencian la primera onda antiviral secretando citoquinas en el epitelio infectado y matando a las células (Muylkens y col., 2007).

La inmunidad celular específica se detecta a partir del quinto día después de la infección y alcanza un pico a los 7-10 días post-infección. Generalmente coincide con la recuperación de las manifestaciones clínicas (Babiuk y col., 1996). Los linfocitos T helper específicos median la lisis de células infectadas con BoHV-1 activando macrófagos y células NK a través de la secreción de IFN γ e IL2, y reclutando y promoviendo la proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos (Muylkens y col., 2007).

La inmunidad humoral específica se vuelve detectable a partir de los 10 días post-infección. Las inmunoglobulinas M son las primeras en aparecer, seguidas por las inmunoglobulinas G (subclase IgG1 en la respuesta primaria, e IgG2 en la secundaria) (Guy & Potgieter, 1985; Romera, 2001). En el caso de IBR, la IgA está restringida a nivel local en el tracto respiratorio superior, mientras que son los mecanismos celulares los que predominan en pulmón y vías aéreas profundas. Según un estudio llevado a cabo por Spilki y col. (2012), animales infectados experimentalmente con BoHV-1 desarrollaron una respuesta humoral luego de la infección aguda primaria, caracterizada por un aumento en los niveles de IgM e IgA

específicos entre los días 2 y 14 post-inoculación (pi). Posteriormente, entre los días 11 y 30 pi se detectó IgG1 y al día 30 IgG2.

Si bien los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra las glicoproteínas de la envoltura viral, su papel es cuestionable en relación con la prevención de la diseminación del virus en la infección primaria, fundamentalmente porque, al igual que otros herpesvirus, el BoHV-1 puede escapar de la acción de éstos debido a su progreso a través de puentes intercelulares. A pesar de ello, la respuesta de los anticuerpos tiene gran importancia en prevenir infecciones secundarias y limitar las consecuencias de la reactivación viral (Babuik y col., 1996). Además, la inmunidad pasiva proporcionada por los anticuerpos calostrales de las vacas inmunes al BoHV-1 es totalmente eficaz para proteger al recién nacido contra cuadros sistémicos y letales (Mechor y col., 1987).

4.2.4.2 *Vacunación*

Para el control y erradicación de las enfermedades causadas por el BoHV-1 se han descrito varios métodos. En países o regiones con baja prevalencia serológica la erradicación es viable eliminando los animales seropositivos (Ackermann & Engels, 2006). Por el contrario, en los países donde la prevalencia es alta, la erradicación es difícil y la enfermedad debe ser controlada con la utilización de vacunas, el uso de toros no portadores del virus y medidas de manejo que ayuden a prevenir el estrés y la transmisión del agente (Alonzo, 2010).

Desde hace ya mucho tiempo existen comercialmente vacunas contra el BoHV-1 y se utilizan en muchos países en sus distintas variantes: a virus vivo modificado o inactivado, mono o polivalente, además de aquellas basadas en vectores o vacunas de subunidades (Muylkens y col., 2007). La mayoría de las vacunas desarrolladas hasta el momento, son eficaces en reducir los síntomas clínicos, la replicación viral post-infección y la transmisión a nivel de campo, pero no evitan la infección y el establecimiento de latencia (Alonzo, 2010). Si se decide vacunar se debe considerar que esta medida de manejo no previene la superinfección con cepas de campo, que el estado inmunitario que provee una vacuna influye en la re-excreción de virus latente, y que existe la posibilidad de eventos tales como recombinación entre cepa vacunal y de campo, así como la reversión a una cepa virulenta. Además, salvo que existan marcadores específicos en las cepas vacunales, los anticuerpos resultantes de la vacuna no permiten la utilización de análisis serológicos que diferencien cepas vacunales de cepas de campo en los programas de control y erradicación (Pidone y col., 1999).

En general, las vacunas vivas modificadas generan inmunidad más rápida, con títulos de anticuerpos neutralizantes más altos y proporcionan una duración más prolongada de la inmunidad que las vacunas inactivadas. Además, las vacunas vivas modificadas también estimulan la inmunidad mediada por células. Por su parte, las vacunas inactivadas son generalmente seguras para su uso en vacas gestantes, aunque ciertas vacunas vivas modificadas pueden llegar a ser utilizadas en dichos animales (Newcomer y col., 2017a).

En un estudio realizado por Anziliero y col. (2014) en la región, se pudo establecer que diferentes vacunas para BoHV-1 generaron respuestas con títulos neutralizantes aceptables. En 2017 un meta-análisis concluyó que la vacunación (tanto con vacunas virales vivas modificadas como inactivadas) contra el BoHV-1 disminuyó el riesgo de aborto en un 60%, confirmando el beneficio de incluir este método como un componente más en el programa de salud de los rebaños (Newcomer y col., 2017a).

En el Uruguay solamente está permitido el uso de vacunas convencionales a virus inactivado, aprobadas oficialmente por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a partir del año 1996. Estas vacunas, si bien no son obligatorias, se utilizan estratégicamente en establecimientos donde existen repercusiones reproductivas a causa del BoHV-1 o como preventivo en algunos casos. Además, desde punto de vista comercial, no existen restricciones en el mercado para la exportación de animales seropositivos ya sea por vacunación o enfermedad. Hasta el momento no existen en nuestro país estudios que midan la respuesta inmune generada por las vacunas que se utilizan, y tampoco en relación con el estado serológico para VLB.

4.3 DIARREA VIRAL BOVINA

4.3.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un virus ARN que pertenece al género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*, y tiene amplia distribución mundial (Ridpath y col., 2010; Yesilbağ y col., 2017). Tres genotipos del VDVB asociados a enfermedad han sido descritos: VDVB-1, VDVB-2 y Pestivirus H o tipo HoBi (Smith y col., 2017), todos ellos clasificados como especies independientes dentro del género *Pestivirus* (OIE, 2019). La variabilidad también está presente dentro de cada genotipo, encontrándose descritos 21 subtipos virales dentro del VDVB-1 y 4 subtipos dentro del VDVB-2 (Yeşilbağ y col., 2017). Independientemente del genotipo al que pertenezca, el virus se clasifica en función del efecto que produce sobre ciertos cultivos de células epiteliales bovinas, en 2 biotipos: biotipos citopáticos (CP) y biotipos no citopáticos (NCP). Sin embargo, la importancia de las lesiones en el transcurso de procesos causados por cepas NCP no se correlaciona con su virulencia in vitro (Pedrera y col., 2008).

El VDVB puede afectar a ganado bovino de cualquier edad, y se trata de uno de los patógenos virales que causa mayores pérdidas económicas en la industria bovina de todo el mundo, asociadas a morbilidad, mortalidad, retraso en el crecimiento, producción de leche reducida, merma en el rendimiento reproductivo y aumento en el desarrollo de otras enfermedades concomitantes (Richter y col., 2017).

Este virus presenta tropismo por los linfocitos B y T, produciendo la destrucción de estos en nódulos linfáticos, bazo, timo y placas de Peyer, disminuyendo además la capacidad fagocítica y bactericida de los neutrófilos (Tizard, 2000). A causa de ello se ha descrito que la inmunosupresión causada por el VDVB tiene el potencial de exacerbar el impacto de coinfecciones. Por lo tanto, este patógeno ha sido asociado con un incremento en la severidad de infecciones respiratorias, entéricas y reproductivas, afectando además el rendimiento de las vacunas (Byrne y col., 2017).

La infección por este pestivirus presenta una amplia gama de manifestaciones clínicas, dentro de las cuales podemos encontrar:

- A) Infecciones agudas: son más frecuentes en animales de corta edad, y pueden ser subclínicas o clínicas con fiebre, signos entéricos, respiratorios y, en ocasiones, septicemia y muerte súbita. Se caracterizan por una alta morbilidad y mortalidad variable, y generalmente se asocian con cepas virales NCP. Durante las infecciones agudas, se produce una viremia breve durante unos 7-10 días y la excreción del virus puede

detectarse en secreciones nasales y oculares. También puede haber leucopenia y trombocitopenia transitorias, sangrado profuso y síndrome hemorrágico (Ridpath y col., 1994), pero son signos que pueden variar mucho entre animales (OIE, 2019).

- B) Infecciones intrauterinas: la infección de una hembra reproductora puede dar lugar a gran variedad de consecuencias, en función de la etapa de gestación en la que haya tenido lugar la infección con VDVB. Antes de los 25 días de gestación, la infección del embrión en desarrollo suele conducir a la muerte embrionaria o fetal, momificación, aborto o mortinatos. Los fetos supervivientes son normales y no estarán infectados. No obstante, la infección de la hembra durante la ventana inmunológica del desarrollo fetal, entre los días 30 y 90 de gestación (particularmente con cepas NCP), invariablemente da lugar a infección fetal, con el nacimiento de terneros con infección persistente (PI) y seronegativos. Los animales PI pueden tener aspecto clínicamente sano o estar débiles y presentar mal aspecto. De todos modos, estos animales presentan una esperanza de vida considerablemente baja, y una gran parte muere antes de llegar a la edad adulta. Aquellos PI que logran sobrevivir hasta la madurez sexual, podrán reproducirse sin problemas, pero su descendencia siempre será también PI. Por último, la infección en fases posteriores y hasta el día 150 de gestación puede conducir a varios defectos congénitos, como hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, defectos ópticos, defectos esqueléticos como la artrogriposis, e hipotricosis. También puede tener lugar un retraso del crecimiento, tal vez como consecuencia de una disfunción hipofisaria. La infección de los fetos bovinos después del día 180 de gestación suele conducir al nacimiento de un ternero normal seropositivo.
- C) Enfermedad de las mucosas (EM): si bien infrecuente, la EM se caracteriza por baja morbilidad y alta letalidad en animales PI, generalmente antes de los 2 años. La EM se asocia con la sobreinfección con un biotipo CP que puede surgir a través de mutaciones o recombinación genómica de la cepa viral NCP que infectan los bovinos PI (Lanyon y col., 2014). El cuadro de EM cursa con anorexia, erosiones gastrointestinales y diarrea profusa, que invariablemente conduce a la muerte (OIE, 2019).

4.3.2 EPIDEMIOLOGÍA

4.3.2.1 Transmisión

La principal vía de transmisión del VDVB es por contacto directo entre animales, por inhalación o ingestión de secreciones nasales, oculares, saliva, orina o heces. El virus también puede transmitirse de forma venérea a través de semen de toros infectados o bien por transferencia de embriones (Guarino y col., 2008). De todos modos, la transmisión vertical desempeña un papel importante en la epidemiología y patogenia de la enfermedad. La exposición al virus conduce a una infección transitoria, seguida de protección inmunológica. Sin embargo, durante una ventana definida en el período de gestación (específicamente en el primer tercio), la transmisión transplacentaria da como resultado la producción de terneros PI (Moennig y Liess, 1995). Es relevante destacar la importancia de los animales PI, ya que son los principales encargados del mantenimiento y diseminación del virus en los rodeos, eliminando grandes cantidades de partículas virales a lo largo de sus vidas (Houe, 1995), con la orina, heces, secreciones corporales, leche y esperma (OIE, 2019). Estos animales se consideran aproximadamente 10 veces más infeccioso que aquellos con infección transitoria (no persistente) (Moerman y col., 1993), motivo por el cual es crítico poder identificarlos y

eliminarlos. Si bien la literatura reporta que el 80 % de los animales PI no supera los dos años de vida, considerando que está reportado que estos animales eliminan entre 1 y 10 millones de partículas virales infecciosas por mililitro de fluido corporal por día, y sabiendo que se estima que solo se requieren 10 partículas para infectar a otro animal, es indiscutible la eficacia de estos animales en perpetuar la infección en los rodeos (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017).

4.3.2.2 Prevalencia

El VDVB es endémico en casi todo el mundo, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas (Yeşilbağ, 2017). Particularmente en América del Sur las infecciones por el VDVB-1 y VDVB-2 han sido bien documentadas (Odeón y col., 2009; Ståhl y col., 2009; Weber y col., 2014), mientras que el virus tipo HoBi solo se ha identificado hasta el momento en Argentina (Pecora y col., 2016) y Brasil (Dias y col., 2017).

En Uruguay, las primeras evidencias de circulación de VDVB se efectuaron en 1996 (Saizar, 1998). Desde entonces los estudios de seroprevalencia de esta enfermedad en los rodeos entre los años 1998-2008 muestran la presencia del virus en el 100% de los establecimientos estudiados (Gil y col., 2000; Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008). Más recientemente, se determinó que los subgenotipos circulantes en el país son predominantemente el VDVB-1a, seguido de VDVB-1i y VDVB-2b (Maya y col., 2016).

4.3.3 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del VDVB se realizan por dos razones, en primer lugar, para identificar si el virus es la causa o parte de un problema clínico que ha sido identificado. Se dispone de una variedad de ensayos para identificar al virus en sangre o hisopados tomados de animales enfermos o muestras de tejido tomadas en necropsia. Por otro lado, la detección de una respuesta inmune contra el VDVB puede ser útil en situaciones en las que se dispone de información previa sobre el estado inmunitario de los animales (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017).

El segundo uso de los ensayos de diagnóstico de VDVB –y el más importante en un programa de control del virus– es para la identificación de bovinos PI. Mediante la identificación y eliminación de los animales PI, el riesgo de transmisión del VDVB dentro y entre los establecimientos se reduce significativamente. Estos animales pueden ser identificados mediante la detección de virus en muestras de sangre o de tejido (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017). En todos los casos, es necesario diferenciar animales PI de infecciones agudas tras una primera muestra positiva, para lo cual es necesario realizar una nueva determinación a las 3-4 semanas posteriores, para confirmar o descartar infecciones persistentes.

Para determinar la presencia del VDVB (detección de PI o infección aguda) se cuenta con el aislamiento viral o bien la detección de antígeno o genoma viral. El aislamiento viral es el método de referencia, 100% específico y altamente sensible, pero económicamente prohibitivo para ser utilizado como de rutina (OIE, 2019). Además, requiere de mano de obra calificada para trabajar con células, equipamiento y disponibilidad de cultivos celulares (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017). Alternativamente podemos utilizar la detección de antígeno viral por medio de ELISA de captura en muestras de sangre, método que es más rápido y económico, por lo tanto, de preferencia en la detección a gran escala de animales PI

(Dubovi, 1996). También se puede detectar el material genético del VDVB por RT-PCR y RT-PCR *real time*, métodos rápidos y sensibles que detectan diversos VDVB y permiten investigar un gran número de muestras en corto tiempo (Dubovi, 1996).

Para determinar los niveles de anticuerpos contra el VDVB, ya sea generados por vacunación o por la exposición natural al virus, se puede optar por ELISAs de anticuerpos o bien Seroneutralización *in vitro*, esta última considerada como *Gold Standard* para determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes (OIE, 2019). El resultado obtenido es dependiente de la cepa de VDVB utilizada en el ensayo, por lo tanto, el análisis de anticuerpos neutralizantes contra un solo tipo de VDVB conduce en muchos casos a la subestimación de la circulación de la enfermedad o a informar resultados falsos negativos (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017).

4.3.4 RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR Y VACUNACIÓN

El VDVB es un patógeno con capacidad de supervivencia en la población bovina utilizando dos estrategias, una de ellas conocida como «choque y fuga» donde el virus ocasiona infecciones agudas, pero con respuesta inmunitaria humoral y celular, aunque de un modo lento, induciendo protección contra nuevas reinfecciones; y la otra estrategia es a través de las infecciones persistentes donde el virus establece inmunotolerancia específica (Peterhans y col., 2003). Además, el VDVB tiene amplia variabilidad genética, pero de todas las cepas agrupadas en los biotipos CP y NCP, solo el NCP puede establecer infección persistente a través de la infección en estadios tempranos del desarrollo fetal, con el fin de persistir evadiendo la respuesta inmunitaria específica (Peterhans y col., 2003).

4.3.4.1 Respuesta inmune innata

En respuesta a la infección con cepas CP del VDVB en el transcurso de infecciones agudas, se produce una rápida y potente respuesta temprana local con la liberación de IFN tipo I por parte de los monocitos-macrófagos o las células dendríticas, responsable de activar a las células efectoras de la respuesta inmune innata como los eosinófilos, los macrófagos y las células NK. De esta forma se limita la replicación del virus a nivel de las mucosas. Esto dará lugar a la captura de antígenos por las células dendríticas y su posterior maduración y migración hacia los nódulos linfáticos locales para presentar el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los linfocitos T, los cuales migrarán hacia el tejido dañado para eliminar al virus y a las células dañadas. Por su parte, las células B activadas migrarán para formar centros germinales en los nódulos linfáticos, donde madurarán hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos que neutralizarán al virus (Brackenbury y col., 2003).

La infección por cepas NCP del VDVB no estimula una respuesta temprana a nivel local con liberación de citoquinas, por lo que no se producirá una respuesta inmune a nivel de las mucosas. Por tanto, la replicación del virus no estará limitada y éste se disemina en gran medida por todo el organismo. A pesar de ello, el virus es vehiculizado hacia los nódulos linfáticos locales donde interacciona con células dendríticas, las cuales van a producir grandes cantidades de IFN α , aumentando a su vez la activación de estas células y limitando la replicación vírica. Se genera así una respuesta inmune primaria efectiva, que, sin embargo, no evita la diseminación del virus (Glew y col., 2003).

Esta respuesta innata es seguida de una respuesta inmune adaptativa que se ve reflejada en la producción de anticuerpos.

4.3.4.2 *Respuesta inmune adaptativa*

El VDVB estimula la producción por parte de los linfocitos T CD4⁺ de altos niveles de IL-4, pero no de IL-2 e IFN, favoreciendo una respuesta Th2. Con esto los linfocitos T CD4⁺ intervendrían ayudando a la producción de anticuerpos neutralizantes para limitar la diseminación del virus, no estando relacionada esta respuesta Th2 con funciones efectoras antivíricas. En muchos procesos virales, el predominio de la respuesta Th2 se ha relacionado con un estado de inmunosupresión. En el caso de la DVB, la respuesta Th2 de células T CD4⁺ que se produce, podría interferir con el desarrollo de una respuesta Th1 protectora frente a otros agentes patógenos como el BoHV-1, pudiendo además contribuir en el establecimiento de infecciones persistentes (Pedrera y col., 2008).

El VDVB y, en general, todos los pestivirus, muestran especial tropismo por las células del sistema inmunitario ocasionando una disminución en la blastogénesis de los linfocitos B y T, hasta que entre la 6^a a 8^a semana post infección se observa un incremento de linfocitos T CD4⁺ indicando que la inmunosupresión es pasajera (Brackenbury y col., 2003). El VDVB posee glucoproteínas que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo la glucoproteína E2 la inmunodominante (Pedrera y col., 2008). La presencia de anticuerpos neutralizantes frente al VDVB es detectable en suero entre las 2 y 4 semanas post-infección, dependiendo de la cepa involucrada, manteniéndose hasta las 10-12 semanas aproximadamente, o bien persistiendo durante toda la vida del animal (Fredriksen y col., 1999). La cantidad de anticuerpos neutralizantes producida depende del genotipo que cause la infección, siendo mayor en los animales infectados por el genotipo 2 (Pedrera y col., 2008).

4.3.4.3 *Vacunación*

Debido a las grandes pérdidas que produce el VDVB, muchos países aplican planes de control para esta enfermedad (Valle y col., 2005; Larghi, 2018; van Duijn y col., 2019). Es así que existen varias estrategias, entre las que encontramos la eliminación de los individuos PI del rodeo, la vacunación o la combinación de ambas (Moennig y col., 2015).

Los dos objetivos primordiales para la utilización de vacunas contra la DVB son, por un lado, generar una cobertura inmunitaria poblacional que limite el impacto de la diseminación de la infección por VDVB en el rodeo, y que reduzca la severidad de los signos clínicos y por ende las concomitantes pérdidas productivas. Por otro lado, las vacunas deben generar una respuesta inmune lo suficientemente sólida para impedir la transmisión vertical del virus en hembras gestantes, evitando así cualquier tipo de consecuencia reproductiva y principalmente la generación de animales PI (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017).

La gran variabilidad genética que presenta el VDVB plantea una serie de desafíos para la eficacia y la seguridad de las vacunas. Los aislados seleccionados para el uso de vacunas deben proporcionar protección cruzada contra las diversas especies y cepas que circulan en los rebaños (Griebel, 2015), y en respuesta a ello, la mayoría de las vacunas actualmente son multivalentes, incluyendo al VDVB-1 y VDVB-2, junto con otras cepas de enfermedades reproductivas o virus respiratorios del ganado bovino (Newcomer y col., 2017b).

Según un meta-análisis realizado por Newcomer y col. (2015) se reveló que la vacunación contra el virus de la DVB disminuye los abortos en un 45%, la tasa de infección fetal también disminuye (en un 85%), aumentando a su vez en un 5% la tasa de preñez. Por el contrario,

según un estudio realizado por Anziliero y col. (2014) la inmunogenicidad del componente VDVB-1 fue indetectable en al menos cuatro vacunas y, VDVB-2 en al menos seis vacunas, lo cual hace evidente que las características en cuanto a la variabilidad antigénica del virus significan un obstáculo a la hora de obtener respuestas satisfactorias en la vacunación.

A pesar de que la vacunación sea un método útil y eficaz, el control del VDVB no se puede lograr por medio ella solamente, independientemente de la calidad de las vacunas, básicamente porque no elimina a los animales portadores del virus (PI). Por ello, al momento de utilizarlas, hay que tener en cuenta el rol relativo de las vacunas en el control del VDVB y la importancia crítica de iniciar un correcto saneamiento de animales PI en los rodeos (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017).

En Uruguay, si bien la DVB es una de las principales virosis del rodeo nacional, se desconocen las pérdidas producidas por dicho agente. La vacunación contra el VDVB no es obligatoria ni tampoco existe un plan oficial voluntario de control para mitigar dichas pérdidas. Las vacunas disponibles comercialmente para la prevención del VDVB en Uruguay se fabrican con virus inactivado y solo pueden proporcionar protección parcial, a diferencia de las vacunas vivas modificadas utilizadas en otras regiones (Newcomer et al., 2017b). La inmunización con vacunas inactivadas y a virus vivo modificado contra VDVB se ha empleado por décadas sin evidencia de una reducción significativa de la prevalencia de la enfermedad o un control de la infección, por lo cual se han empezado a desarrollar otras estrategias experimentales como las vacunas recombinantes, donde se seleccionan genes específicos del VDVB con el fin de inmunizar al ganado buscando superar los inconvenientes de las vacunas convencionales (Vargas y col., 2009).

Es importante destacar que en nuestro país no existen estudios que evalúen la eficacia vacunal en cuanto a su capacidad para producir anticuerpos neutralizantes y para reducir la signología clínica de la enfermedad, así como tampoco se ha estudiado ello en relación con el estatus serológico para VLB.

5 HIPÓTESIS

Existen diferencias significativas en la respuesta inmune humoral a campo de vaquillonas inmunizadas con vacunas reproductivas comerciales que sean VLB positivas (VLB+), en comparación con aquellas VLB negativas (VLB-).

6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune humoral frente a la vacunación contra el BoHV-1 y VDVB en vaquillonas infectadas con el VLB.

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el título de anticuerpos neutralizantes contra el BoHV-1 en animales libres e infectados con VLB.
- Determinar el título de anticuerpos totales, IgG1 e IgG2 contra el BoHV-1 en animales libres e infectados con VLB.
- Determinar el título de anticuerpos totales contra el VDVB en animales libres e infectados con VLB.
- Determinar la prevalencia de animales persistentemente infectados con el VDVB.
- Asociar la respuesta inmune humoral frente a BoHV-1 y VDVB con el estatus de infección para VLB.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 CARACTERIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO Y MEDIDAS DE MANEJO UTILIZADAS

El estudio se llevó a cabo en un establecimiento de La Cruz, Departamento de Florida, Uruguay, donde se realiza la cría de terneras de raza Holando de diferentes productores lecheros de la zona. Un lote de ingreso con aproximadamente 8 meses de edad permaneció en el campo en torno a 18 meses, hasta su regreso al productor original con alrededor de 7 meses de gestación. Es de destacar que el establecimiento no presenta exigencias sanitarias en relación con el ingreso de animales con serología positiva a LBE. Ingresaron al período reproductivo Noviembre-Diciembre de 2019, 562 animales. Cada uno fue identificado, y aproximadamente la mitad de las vaquillonas (276) fueron inmunizadas con doble dosis los días - 60 y - 30 pre-servicio, de una vacuna comercial que contiene una suspensión inactivada de Herpesvirus Bovino tipo 1 y tipo 5; virus de Diarrea Viral Bovina tipo 1 y tipo 2; *Leptospira interrogans* serovares: Canicola, Grippotyphosa, Hardjo tipo Hardjo-prajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffi, y *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo tipo Hardjo-bovis; *Campylobacter fetus* subsp. Fetus, subsp. venerealis, y subsp. venerealis biotipo intermedius. Esta vacuna fue aprobada por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) de acuerdo con la normativa nacional vigente en Uruguay.

8.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

De cada animal se extrajeron dos muestras de sangre de la vena coccígea, una con anticoagulante (EDTA) y otra muestra sin el mismo, los días 0, 30, 60 y 160 post-inmunización. Estas últimas, correctamente rotuladas en tubo seco, fueron coaguladas a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. El suero fue extraído y almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Se contó con la aprobación del protocolo experimental para la utilización de ganado, por parte de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal – UdelaR (CEUA-FVET-972 111900-001057-19).

8.3 CONFORMACIÓN DE GRUPOS

Para conocer si las hembras bovinas libres de VLB generan una respuesta inmune humoral a campo significativamente mayor que los animales infectados con el virus, primero se conformó un grupo aleatorio de muestras analizadas en el laboratorio (n=217). De ellas 113 (113/217) vaquillonas eran VLB+, de las cuales 106 fueron vacunadas y el resto control; mientras que 104 (104/217) animales eran VLB-, siendo 92 vacunados y el resto control.

Se determinó el estatus serológico de los animales contra VLB mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Se utilizaron kits comerciales para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del VLB en suero, con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (IDEXX Leukosis Blocking Test, IDEXX Laboratories).

Las muestras se procesaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante, utilizándose 50µl de suero diluido 1:2 sobre microplacas sensibilizadas con un lisado ultrapurificado del VLB.

Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron los lavados y se adicionó el conjugado correspondiente (anticuerpo monoclonal anti-gp51 unido a una enzima peroxidasa) y se volvió a incubar a la misma temperatura por 1 hora. Luego de volver a lavar y agregar el substrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina o TMB), y tras una tercera incubación por 20 minutos a temperatura ambiente y lejos de la luz directa, se colocó la solución de frenado y se realizó la lectura de la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-gp51 presentes en la muestra, y el resultado se obtiene comparando la D.O. de la muestra con la media de los controles negativos. Se consideraron como positivos aquellos animales con resultados menores al 40%.

8.4 HEMOGRAMA

A fin de conocer aquellos animales VLB+ con linfocitosis persistente, se realizó hemograma a cada una de las muestras con EDTA, en los primeros tres muestreos. Se utilizó el protocolo descrito por Marshak (1968), considerándose como normales 4000-12000 leucocitos/ μ l y 2500-7500 linfocitos/ μ l (Veterinary Diagnostic Laboratory, Oregon State University).

8.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MEDIANTE SERONEUTRALIZACIÓN *in vitro* CONTRA BoHV-1

Para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 en los animales inmunizados, se realizó la técnica Seroneutralización *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de la OIE (OIE, 2019).

Las células utilizadas en esta técnica se obtuvieron realizando cultivos de la línea celular MDBK - CRIB (Flores y Donis, 1995) que fueron mantenidas en crecimiento a 37°C en Medio Esencial Mínimo (MEM) (gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos al 1% (solución de Penicilina/Streptomycin 100x con L-glutamina). Dichas células se incubaron con el medio hasta obtener confluencia celular del 80 a 100%.

Inicialmente se realizó la inactivación del complemento a 56°C durante 30 minutos de cada una de las muestras. Luego en placas estériles de 96 pocillos, se colocaron 50 μ l de cada suero por duplicado y en diluciones crecientes (1:2 hasta 1:256) junto a la misma cantidad del virus conteniendo 100 unidades infectantes (UI) de BoHV-1. En cada placa se utilizaron controles celulares, así como control de virus descarga (100 UI), 1 y 0 unidades infectantes. Tras una incubación de 24 horas en estufa a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂, se adicionaron 50 μ l de una suspensión de células CRIB (ajustada a una concentración de 30.000 células/50 μ l en MEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico al 1%). En los siguientes 5 días de incubación y cada 24hs aproximadamente, se evaluó el efecto citopático en cada pocillo, determinándose el título seroneutralizante para cada uno de los sueros problemas, previa verificación del resultado en los sueros controles empleados en la prueba. Se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo título de anticuerpos neutralizantes fue igual o superior a 1/16 (Pospíšil y col., 1996).

8.6 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE ELISA CONTRA BoHV-1

8.6.1 ANTICUERPOS TOTALES

Para la detección de anticuerpos totales anti BoHV-1 se utilizó un kit comercial de ELISA (IDEXX Trachitest Serum Screening Ab Test, IDEXX Laboratories), siguiendo las indicaciones del fabricante. En cada placa sensibilizada con un lisado ultrapurificado del BoHV-1, se colocaron 100µl de los sueros problema diluidos 1:100, al igual que los controles positivos y negativos, tras lo cual se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes se le adicionaron 100µl del conjugado diluido 1:50 (proteína G marcada con peroxidasa), incubándose durante 30 minutos a la misma temperatura. Finalmente, y tras un nuevo lavado, se agregó 100µl del sustrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina o TMB) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz (placas cubiertas). Luego de colocar 100µl de solución de frenado en cada pocillo, se procedió a realizar la lectura a 450nm en un espectofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue proporcional al título de anticuerpos en la muestra y se consideraron positivas aquellas que resultaron por encima del 50%.

8.6.2 CUANTIFICACIÓN DE ISOTIPOS IgG1 E IgG2

Para detectar los isotipos IgG1 e IgG2, se utilizó un kit de ELISA *in house* indirecto, desarrollado en el laboratorio de Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Uruguay (Leites y Puentes, 2017), utilizando conjugados bovinos comerciales (*Jackson Immuno Research Laboratories INC*).

En placas previamente sensibilizadas con antígeno viral (cepa LA de BoHV-1), se agregaron 50µl de los sueros por duplicado y diluidos 1:2 con solución de dilución rojo fenol. Cada placa presentó sueros controles positivo y negativo, control celular y de antígeno. Se incubó por 1 hora a 37°C. Luego de los lavados correspondientes, se adicionó el conjugado apropiado para cada subclase de IgG, y se realizó una nueva incubación por 1 hora a la misma temperatura. Tras ello se colocaron 50µl de solución TMB en cada pocillo, incubándose por 20 minutos y efectuándose el revelado luego de colocar 50µl de solución de frenado. La lectura de la D.O. se realizó a 450nm en un espectofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se consideraron positivos aquellos sueros con un porcentaje igual o mayor a 120%.

8.7 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES MEDIANTE ELISA CONTRA VDVB

Utilizando un kit de ELISA comercial (BIO-X Diagnostics, Blocking test for blood sera and plasma), se colocaron tanto los controles positivo y negativo como los sueros en una dilución 1:2, en placas sensibilizadas con la proteína E0 del VDVB. Se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Luego de los lavados correspondientes, se colocaron 100µl del conjugado en dilución 1:50 (anticuerpo monoclonal específico contra la proteína E0 del VDVB, adherido a una peroxidasa) y se incubó por 30 minutos a la misma temperatura. Posteriormente a un nuevo

lavado, se adicionó la solución cromogénica (TMB) y se dejó la placa en un ambiente oscuro por 10 minutos. Finalmente se colocó la solución de frenado y se realizó la lectura de la D.O. a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue inversamente proporcional al título de la muestra de suero y se consideraron positivas aquellas muestras con un resultado superior a 50%.

8.8 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS MEDIANTE ELISA CONTRA VDVB

Se utilizó el kit de ELISA comercial (IDEXX Bovine Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus, IDEXX Laboratories), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, en placas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales específicos para la glicoproteína *Erns* de VDVB, se colocaron 50µl de solución de detección en cada pocillo, además de los controles positivo y negativo. Posteriormente se añadieron 50µl de cada muestra, siendo el antígeno capturado por los anticuerpos de la placa. Se incubó a 37°C ± 3°C durante dos horas y se realizaron lavados, tras lo cual se agregaron en cada pocillo 100µl de conjugado, incubándose a la misma temperatura por 30 minutos. Luego de este paso y otro lavado, se agregó 100µl de cromógeno (TMB) a la placa y se incubó protegido de la luz durante 10 minutos. La formación de inmunocomplejos se detectó por la aparición de un color azul y tras añadirse 100µl de solución de frenado se generó un viraje hacia el amarillo. La intensidad del color resultante de la actividad enzimática es proporcional al contenido de elementos patógenos en las muestras. La lectura de la D.O. se efectuó a 450 nm. en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Esta prueba ELISA permitió la detección de animales PI para DVB, y se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo coeficiente fue mayor a 0,300.

Es importante mencionar que esta técnica fue efectuada a los días 0 y 30 del ensayo.

8.9 ELABORACIÓN DE REGISTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se elaboraron planillas utilizando Microsoft Office Excel, registrándose a cada animal individualmente y los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos. Para comparar el título de anticuerpos obtenidos a las virosis reproductivas entre grupos positivos y negativos a VLB, se realizó una comparación de medias por la prueba t de student con un nivel de significancia del 95 %, utilizando el software Graphpad prism versión 8.4.3 y un análisis de varianza de la media ANOVA.

9 **RESULTADOS**

9.1 **PREVALENCIA DE VLB EN EL RODEO**

La prevalencia serológica para VLB al ingreso de las vaquillonas al período reproductivo fue de 63.2% (352/557), con 5.97% (21/352) de animales que al hemograma evidenciaron linfocitosis. Luego de pasados los 160 días, se pudo constatar la seroconversión de 43 animales, llegando a obtenerse una prevalencia de 74.6% (397/532), para lo cual se contemplaron 25 animales que salieron del establecimiento antes de lo previsto. La prevalencia de animales con linfocitosis persistente al final del período reproductivo fue de 5.54% (22/397).

Al final del período reproductivo de las 217 muestras analizadas para la respuesta a la vacunación, seroconvirtieron 26 vaquillonas, las cuales no se utilizaron para el análisis.

Por último, el 76,7% (366/477) de los animales se encontraron dentro de la categoría 2 dientes, mientras que el 19,9% (95/477) eran de la categoría diente de leche y 3,35% (16/477) de la categoría 4 dientes. No existieron diferencias significativas entre la edad (todas vaquillonas) y la condición a VLB ($p=0,421$).

9.2 **ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BoHV-1**

Al inicio del experimento, se realizó Seroneutralización *in vitro* a una muestra de 217 animales en cada uno de los sangrados del ensayo (día 0, 30, 60 y 160). De ellos, el 30,4% (66/217) presentó títulos de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 16 al día 0, de los cuales 62 pertenecían al grupo de vaquillonas falladas en el primer período reproductivo del año del establecimiento (Junio-Julio). Los mismos no fueron utilizados al momento de analizar la respuesta a la vacunación.

Con los resultados de BoHV-1 obtenidos, se conformaron tres subgrupos de animales vacunados: el primero con $n=64$ VLB+ aleucémicos (VLB+ AL); el segundo con $n=6$ VLB+ que presentaron LP (VLB+ LP), y por último un grupo con $n=40$ VLB-.

Según se expresa en la Tabla 1, tanto animales VLB- como el VLB+ desarrollaron anticuerpos neutralizantes frente a la primovacunación el día 30, con mayor número de animales que respondieron luego de la segunda vacunación el día 60. El título de anticuerpos protectores luego del tercer sangrado en todos los casos disminuyó hacia el día 160. A pesar de ello, no existieron diferencias significativas entre los subgrupos conformados, en ninguno de los sangrados.

Tabla 1 Título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 16 contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en cada sangrado post-vacunación y según estado para VLB, mediante Seroneutralización in vitro

Grupo	Día 0	Día 30	Día 60	Día 160
VLB+ AL n=64	#0	#19 1 (16) 6 (32) 6 (64) 4 (128) 2 (256)	#34 16 (16) 13 (32) 3 (64) 2 (128) 0 (256)	#13 12 (16) 0 (32) 1 (64) 0 (128) 0 (256)
VLB+ LP n=6	#0	#2 0 (16) 0 (32) 2 (64) 0 (128) 0 (256)	#3 2 (16) 1 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)	#2 1 (16) 1 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)
VLB- n=40	#0	#11 1 (16) 2 (32) 2 (64) 2 (128) 4 (256)	#25 14 (16) 5 (32) 4 (64) 2 (128) 0 (256)	#11 8 (16) 3 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)

VLB+ AL (animales positivos al virus de la leucosis bovina, aleucémicos); VLB+ LP (animales positivos al virus de la leucosis bovina, con linfocitosis persistente); VLB- (animales negativos al virus de la leucosis bovina). Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente

9.3 ANTICUERPOS TOTALES E ISOTIPOS CONTRA BoHV-1

9.3.1 ANTICUERPOS TOTALES

Para el estudio de la cinética de anticuerpos totales contra BoHV-1 se utilizaron los mismos sub-grupos antes mencionados.

Como se observa en la Figura 2, se evidenció un claro aumento en el título de anticuerpos totales a los 30 ($x= 98.23$) y 60 ($x= 191.8$) días post vacunación (dpv), en relación a los animales no vacunados. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,025000$ y $p=0,000002$ respectivamente).

Por su parte, evaluando los subgrupos de animales vacunados por separado (Figura 3), si bien numéricamente aquellos VLB- presentaron mayor título de anticuerpos totales contra BoHV-1, con respecto a los VLB+ AL, y VLB+ LP, esta diferencia no fue significativa. De todos modos, hacia los 60 dpv existió una tendencia ($p=0,1$), donde los animales VLB+ LP presentaron menor título de anticuerpos totales.

Luego del tercer sangrado, los títulos de anticuerpos totales disminuyeron hacia el día 160, pero de todos modos manteniéndose por encima de los niveles encontrados 30 dpv.

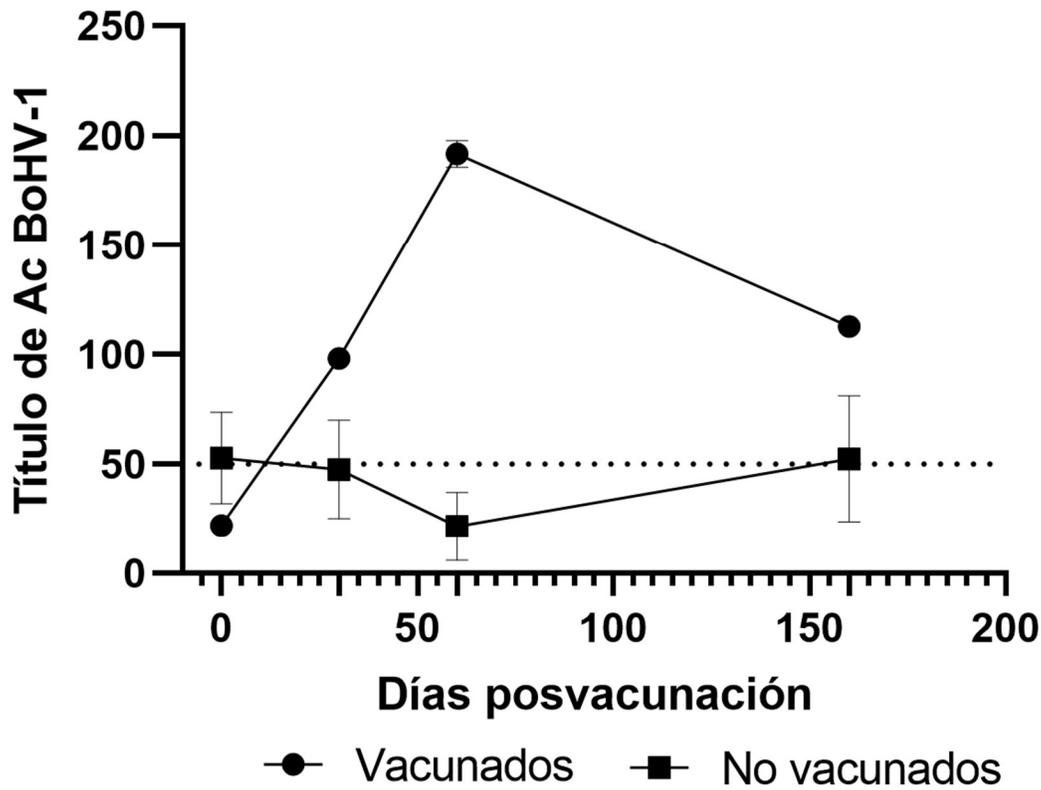


Figura 2 Cinética de anticuerpos totales contra *Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1)* para animales vacunados y no vacunados, mediante *ELISA* a lo largo del ensayo. Animales vacunados representados con círculos (n=110); animales no vacunados representados con cuadrados (n=19). El eje de las ordenadas corresponde al título de anticuerpos contra BoHV-1; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Se representan los errores estándar de los títulos medios. El grupo de animales vacunados recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente

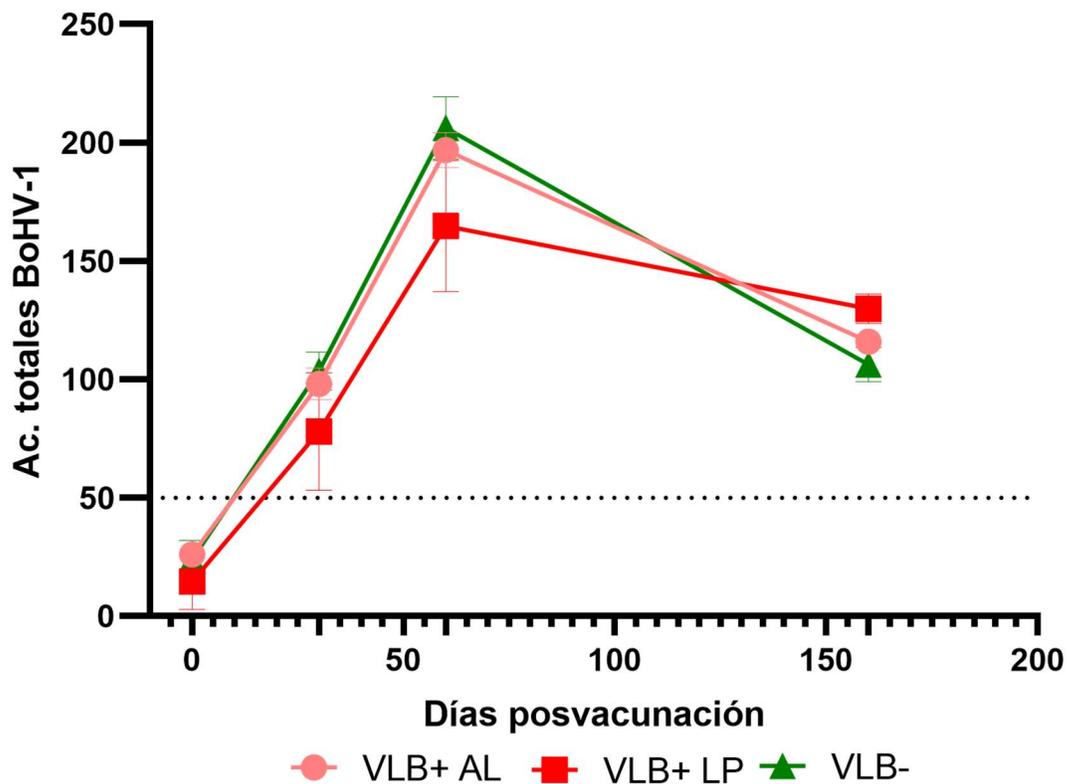


Figura 3 Cinética del título de anticuerpos totales contra *Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1)* en animales vacunados y según estado para VLB, mediante *ELISA* a lo largo del ensayo. Animales positivos al virus de la leucosis bovina y aleucémicos (VLB+ AL n=64) en círculos, animales positivos al virus de la leucosis bovina y con linfocitosis persistente (VLB+ LP n=6) en cuadrados, animales negativos al virus de la leucosis bovina (VLB- n=40) en triángulos. El eje de las ordenadas corresponde al título de anticuerpos expresados en porcentaje de inhibición (% inh) contra BoHV-1; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Se representan los errores estándar de los títulos medios. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.3.2 ISOTIPOS IgG1 e IgG2

Como se expresa en la Figura 4 a), luego de la vacunación los animales VLB+ LP presentaron un aumento en el título del isotipo IgG1 numéricamente mayor que aquellos VLB+ AL y VLB-. Estos valores se mantuvieron consistente durante todos los sangrados posteriores a la inmunización, existiendo una tendencia ($p=0,1$) 30 dpv entre los VLB- ($x=0,38$) y los VLB+ LP ($x=0,51$). Por su parte, 30 dpv el subgrupo VLB+ AL desarrolló mayor título de anticuerpos IgG1 con respecto al subgrupo VLB- ($p=0,04$).

En relación con el isotipo IgG2 (Figura 4 b), el título fue numéricamente mayor en el subgrupo VLB- con respecto al VLB+ (AL/LP), con una tendencia al día 60 luego de la vacunación ($p=0,08$).

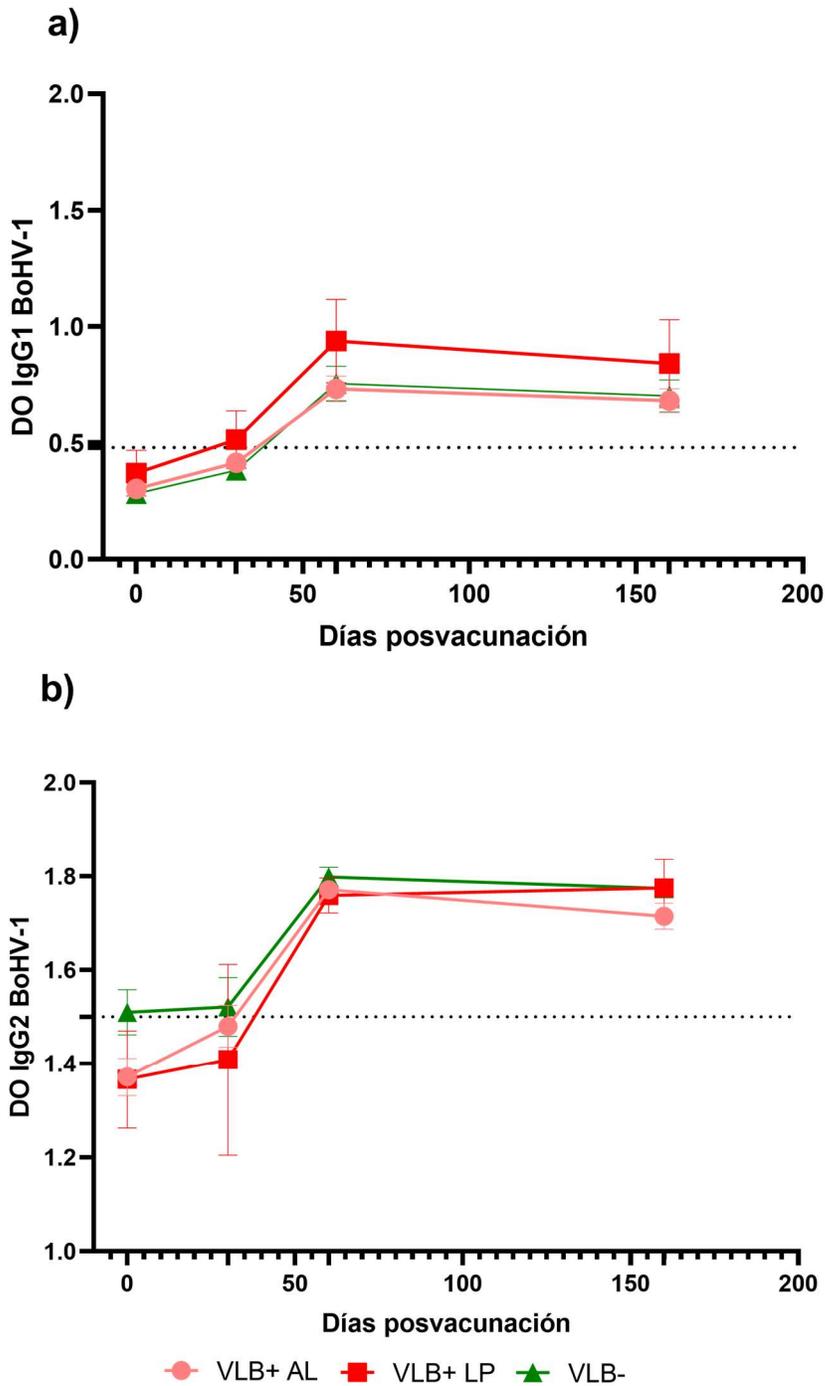


Figura 4 Cinética del título de anticuerpos (isotipos IgG1 e IgG2) contra *Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1)* en animales vacunados y según estado para VLB, mediante ELISA a lo largo del ensayo. Animales positivos al virus de la leucosis bovina y aleucémicos (VLB+ AL n=64) en círculos, animales positivos al virus de la leucosis bovina y con linfocitosis persistente (VLB+ LP n=6) en cuadrados, animales negativos al virus de la leucosis bovina (VLB- n=40) en triángulos. a) isotipo IgG1 b) isotipo IgG2. El eje de las ordenadas representa la densidad óptica (DO); el eje de las abscisas representa los días post-vacunación. Se representan los errores estándar de los títulos medios. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente

9.4 ANTICUERPOS TOTALES PARA VDVB Y PREVALENCIA DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS EN EL RODEO

La seroprevalencia al día 0 para el VDVB fue de 97,6% (453/464). A los 11 (11/464) animales seronegativos en el primer sangrado se les realizó el seguimiento en los sangrados posteriores a la vacunación (día 30, 60, 160). En general, se observa que el grupo en estudio no respondió a la utilización de la vacuna contra el VDVB y sólo 2 animales presentaron una respuesta numéricamente mayor a 50%. En este sentido no se evidencian diferencias significativas en la respuesta inmune humoral de animales VLB+ y VLB- para VDVB.

Tras la realización de la técnica ELISA antígeno en dos muestreos (a los días 0 y 30) en el grupo seronegativo, se encontró una prevalencia de 0,2% de animales PI dentro del total en estudio (1/464). Por su parte, mediante su seguimiento durante los sangrados de todo el ensayo, se pudo confirmar que el animal PI tampoco desarrolló respuesta inmune a la vacunación.

10 **DISCUSIÓN**

El VLB es de importancia mundial por su gran distribución e incidencia, siendo la principal virosis que afecta a los rodeos lecheros en nuestro país. El 90% de los animales infectados son asintomáticos (60% aleucémicos y 30% con LP), produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la limitación en la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad de los animales y disfunciones importantes en su sistema inmune (Bartlett y col., 2013). Es conocido que la infección por este retrovirus genera disturbios a nivel de la inmunidad humoral y celular (Kabeya y col., 2001; Gillet y col., 2007; Frie y Coussens, 2015; Blagitz y col., 2017), desconociéndose hasta el momento el impacto económico que ello supone. Se ha determinado que existe un incremento muy importante en la población de linfocitos B, con disminución en los porcentajes tanto de linfocitos T CD4+ como T CD8+ (Sordillo y col., 1994). Así pues, a pesar de que el linfosarcoma ocurra en una proporción pequeña del ganado infectado con VLB, el virus puede tener efectos más sutiles sobre la salud del rodeo, incluso teniendo impacto sobre los programas de vacunación (Erskine y col., 2011). Vinculado a ello, en este estudio se buscó determinar si las vaquillonas VLB- y VLB+ eran capaces de generar una respuesta inmune diferencial frente a la administración de una vacuna comercial contra BoHV-1 y VDVB, ambos patógenos virales ampliamente distribuidos, y con gran impacto reproductivo en la producción lechera a nivel mundial y local.

La prevalencia serológica contra VLB al ingreso de los animales al período reproductivo fue de 63,2% y 74,6% al finalizar el ensayo (6 meses). Estos resultados fueron algo superiores en relación a estudios previos realizados en Uruguay, donde en 2013-2014 se encontró una seroprevalencia de 45% en un sistema de cría de ganado lechero bajo las mismas condiciones del presente trabajo, y 52,7% luego de los períodos reproductivos (18 meses) (Puentes y col., 2016a). Sin embargo, son más cercanos a los resultados obtenidos en 2015, en el marco de un muestreo serológico aleatorio, donde la prevalencia serológica media para VLB fue de 78,8% (Riet Correa y col., 2019). A pesar de ello, en el presente ensayo la mayoría de los animales eran jóvenes, siendo el 76,7% categoría dos dientes, mientras que en el trabajo antes mencionado se trataba de animales en producción. En tanto, es importante destacar que el hecho de tener altas prevalencias en el rodeo condiciona a la aparición de la infección a más temprana edad (DiGiacomo, 1992; Monti y col., 2007), lo que se puede asociar a los resultados encontrados en este ensayo.

Por su parte, el porcentaje de animales con LP rondó valores cercanos al 6%, lo cual es llamativo, teniendo en cuenta que en general, al tratarse de una infección crónica, se requiere de largos períodos de latencia antes de llegar a dicha fase. En este sentido es interesante mencionar el estudio realizado por Gutiérrez y col. (2014b), donde se trabajó con animales en su etapa perinatal (hasta los 36 meses), al igual que en el presente trabajo, sugiriéndose que tras el contagio ya sea pre o postnatal, el rápido aumento de la carga proviral es indicativo de que la respuesta inmune, aún en desarrollo de los animales, no detiene la replicación del VLB. Algunas citoquinas que regulan la expresión del virus y retrasan la progresión a LP en adultos, incluidos el IFN γ e IL-2, son deficientemente expresados en animales jóvenes. A su vez, la alta carga proviral en las madres de estos animales podría relacionarse con la alta probabilidad de infección de sus terneros (Gutiérrez y col., 2014b). Aunado a esto, los animales jóvenes son los que más se movilizan y por lo tanto pueden desempeñar un papel

activo en la diseminación del VLB. A pesar de que en el establecimiento de esta investigación se aplicaron buenas prácticas de higiene en los diferentes procedimientos, desinfectando instrumental quirúrgico, cortantes y agujas, es igual de importante la identificación temprana de vaquillonas con LP para su posterior eliminación. En efecto, en un estudio realizado por Juliarena y col. (2007) se pudo establecer que animales con LP presentan consistentemente alta carga proviral en leucocitos de sangre periférica (clasificados como HPL). Por esta razón se trata de animales con gran capacidad propagadora del virus y su correcto manejo permitiría disminuir la prevalencia de VLB en los rodeos lecheros de nuestro país.

El BoHV-1 es la principal causa de abortos de etiología viral en bovinos a nivel mundial, produciendo grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Muylkens y col., 2007). En Uruguay, la infección con este virus se encuentra ampliamente distribuida. En el presente estudio, la prueba de Seroneutralización *in vitro* (técnica de referencia por la OIE) reveló la presencia de anticuerpos neutralizantes en el 30,4% (66/217) de los animales estudiados, al inicio del ensayo. Según un trabajo realizado por Repiso y col. (2005), la prevalencia serológica general fue de 36,6%, mientras que Guarino y col. (2008) y Furtado (2016), encontraron seroprevalencias de 45% y 25,6% respectivamente. Esto revela una distribución dispersa de la infección en nuestros rodeos. Asimismo, es importante destacar que de las 66 vaquillonas inicialmente seropositivas contra el BoHV-1, 62 pertenecían al grupo de animales fallados en el primer período reproductivo del año del establecimiento (Junio-Julio). En este sentido es posible sugerir que, sabiendo que previamente los animales no habían sido vacunados, la causa de infertilidad podría estar asociada a la exposición natural al BoHV-1, ya que es conocida su capacidad de provocar muertes embrionarias con retorno al celo, como consecuencia de la infección del tracto respiratorio o genital (Miller y col., 1991, Alonzo y col., 2012). Las repercusiones de esta virosis sobre la fertilidad de las hembras bovinas han sido reconocidas durante muchos años, destacándose el informe publicado por Kendrick y col. (1967), donde animales inseminados con semen infectado manifestaron signos clínicos de IPV, retornando al celo 9-13 días después. Sumado a ello también se asoció el desarrollo de endometritis necrotizante crónica. Por su parte, Miller y Van der Maaten (1985; 1986; 1987) en sus múltiples estudios demostraron que la infección con BoHV-1 provoca endometritis, ooforitis, necrosis luteal y como consecuencia disminución de los niveles de progesterona, lo cual puede ocasionar mortalidad embrionaria y afectar el siguiente ciclo estral. Más recientemente en Uruguay, Alonzo y col. (2012) en su trabajo concluyeron que el porcentaje de preñez en su diagnóstico a los 52 días, en un grupo de animales con infección aguda fue menor que el grupo control (33% y 86%, respectivamente), lo cual determinó un retraso en la preñez de los animales infectados con el virus.

Mientras tanto, si se considera el grupo de animales sin anticuerpos neutralizantes al comienzo del ensayo, e independientemente del estatus para VLB, la doble dosis de inmunización aplicada, según demuestran los resultados obtenidos, generó una estimulación del sistema inmunológico, siendo suficiente para producir una respuesta al BoHV-1 con títulos de anticuerpos totales aceptables. Se observó una media en los títulos de anticuerpos de $x=98.23$ y $x=191.8$, 30 y 60 dpv respectivamente, demostrándose diferencia significativa ($p<0.05$) con el grupo control no vacunado. A pesar de ello, es importante destacar que la respuesta de anticuerpos neutralizantes fue pobre, encontrándose que menos del 50% de los animales de cada grupo desarrollaron títulos iguales o superiores a 1/16 (Pospíšil y col., 1996), considerados como aceptables. En este sentido es interesante comparar el desempeño

de la vacuna utilizada en el presente ensayo con el de otros trabajos. Como ejemplo, en un estudio realizado por Silva y col. (2007a), de las seis vacunas comerciales contra el BoHV-1 testeadas, una de ellas, de origen uruguayo, generó títulos de anticuerpos neutralizantes compatibles con protección en todos los animales. Más recientemente, Anziliero y col. (2014), en sus estudios concluyeron que a excepción de dos vacunas que indujeron seroconversión en 8/10 y 9/10 animales, los demás productos utilizados generaron anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 en todos los animales vacunados, con títulos protectores aceptables. Así pues, concluyeron que la inmunogenicidad de la mayoría de las vacunas comerciales utilizadas fue aceptable y, probablemente, suficiente para lograr la inmunización adecuada de los rebaños. Del mismo modo, en un meta-análisis llevado a cabo por Newcomer y col. (2017a), se concluyó que la vacunación (tanto con vacunas virales vivas modificadas como inactivadas) contra el BoHV-1 disminuyó el riesgo de aborto en un 60%, confirmando el beneficio de incluir este método como un componente más en el programa de salud en los establecimientos.

En este contexto, en el presente ensayo es relevante mencionar la importancia de la activación primaria del sistema inmune generada 30 dpv, tras la dosis vacunal inicial. Con ello, luego de la segunda inmunización, los títulos de anticuerpos alcanzados fueron aún mayores, lo cual permitiría a los animales desencadenar una respuesta inmunitaria rápida y eficaz tras la posible re exposición al BoHV-1. Aunado a ello, si bien luego del día 60 los títulos de anticuerpos totales disminuyen, no lo hacen por debajo del límite de protección aceptable, al menos hasta el sangrado al día 160. Si bien no se conoce la dinámica luego de dicho momento, no podemos descartar que efectivamente se genere una meseta en la respuesta inmunológica a la vacuna, lo cual sería deseable para mantener la protección. En este sentido podría haber sido necesario realizar un sangrado posterior.

A pesar de la respuesta satisfactoria a la vacunación en todos los casos, no existieron diferencias significativas entre los subgrupos VLB+ AL, VLB+ LP y VLB-, tanto para anticuerpos neutralizantes como totales, en ninguno de los sangrados. Si bien no fue posible establecer una asociación estadística entre la condición a VLB y la respuesta inmune humoral generada por la vacuna, se registró una tendencia hacia los 60 dpv ($p=0,1$), donde animales VLB+ LP presentaron menor título de anticuerpos totales. Al respecto, ha sido comprobado que el ganado infectado con VLB genera una respuesta de anticuerpos defectuosa a desafíos específicos, con mecanismos de supresión inmunológica que afectan tanto la vía humoral como la celular (Sordillo y col., 1994). Trainin y col. (1976) demostraron que el ganado LP tras ser inoculado con antígenos sintéticos, tardó el doble de tiempo en producir anticuerpos específicos, en comparación con aquellos animales no infectados, además de generar una respuesta inconsistente. Más recientemente Frie y col. (2016) mencionan que, tras la vacunación contra BoHV-1, los bovinos VLB+ produjeron menores títulos de anticuerpos, particularmente IgG2 contra dicho virus, en comparación con el ganado libre de VLB.

Sin embargo, como ha sido comprobado previamente por nuestro grupo de trabajo (Puentes y col., 2016b), si bien no se observan diferencias a nivel de anticuerpos totales, si se aprecian en el perfil específico de respuesta a la vacunación. En tal sentido es importante mencionar que la inducción de isotipos específicos favorece el desarrollo de mecanismos efectores, y, junto a la inmunidad celular, es importante en la respuesta a la vacunación. Se ha determinado que la vacunación contra el BoHV-1 genera un incremento en los títulos de IgG1 e IgG2,

estableciéndose que valores de la relación IgG2/IgG1 mayores a 1 se asocian con mayores niveles de protección frente al desafío posterior con el virus (Romera, 2001). Según los datos obtenidos en el presente estudio, la relación IgG2/IgG1 se mantuvo en todos los sangrados por encima a 1. De este modo, evaluando la respuesta diferencial de isotipos, el subgrupo VLB+ LP presentó un aumento en el título del isotipo IgG1 numéricamente mayor que los animales VLB+ AL y VLB-, existiendo una tendencia al día 30 ($p=0,1$). Por su parte, las diferencias significativas se constataron a los 30 dpv para el subgrupo VLB+ AL, que desarrolló mayor título de anticuerpos IgG1 con respecto al subgrupo VLB- ($p=0,04$). Vinculado a dichos resultados, es posible referir a estudios que han demostrado que las alternancias en la expresión de citoquinas se correlacionan y pueden contribuir con la progresión de la enfermedad en infecciones retrovirales crónicas (Kabeya y col., 2001). Así, según Pyeon y Splitter (1998), animales VLB+ en las primeras etapas de la infección (AL) desarrollan una respuesta celular mediada principalmente por linfocitos T helper 1 (Th1), productores de IL-2, IL-12 e IFN- γ ; pero tras la progresión de la enfermedad, junto con la LP, se producen cambios en el perfil de células T. En efecto, la respuesta se modifica por linfocitos T helper 2 (Th2), productores de IL10 e IL-4 (Sordillo y col., 1994, Konnai y col., 2003). Asociado a ello, también se ha demostrado que la expresión de IgG1 está regulada positivamente por IL-4, mientras que la expresión de IgG2 está regulada positivamente por el IFN- γ (Estes y Brown, 2002). Por lo tanto, a pesar de no encontrar evidencia estadística de que el subgrupo VLB+ LP produjo mayor título de IgG1 que el VLB-, si existe una tendencia a los 30 dpv, que podría responder al cambio hacia una respuesta Th2, con disminución de la expresión de citoquinas tipo 1 y aumento de IL4, lo cual favorece la producción de IgG1 por los animales con LP. La ausencia de diferencias significativas podría verse argumentada por el limitado número de animales LP (6). En este sentido en el marco de la continuación del presente ensayo, se realizará el estudio de los niveles de IL-4 en animales con LP, en busca de aumentos significativos de esta citoquina, en comparación con ganado libre de VLB. De este modo se podría comprender mejor el comportamiento de la respuesta inmune celular en animales infectados con el virus. Por último, es relevante mencionar las diferencias significativas encontradas entre el subgrupo VLB+ AL y VLB-, donde el primero desarrolló mayor cantidad del isotipo IgG1. Según Romera (2001), la mayor respuesta de IgG2 en animales vacunados contra BoHV-1 se logra recién tras una segunda revacunación. Es así que, en el presente ensayo solo se aplicaron dos dosis de vacuna comercial, obteniéndose datos hasta el día 160, por lo cual el hallazgo de mayores cantidades de IgG1 sería consistente con lo antes mencionado.

En relación con el isotipo IgG2, se encontró que el título fue numéricamente mayor en el subgrupo VLB- con respecto al VLB+ (AL/LP), con una tendencia a su favor, al día 60 luego de la vacunación ($p=0,08$). Esto es consistente con el estudio realizado por Erskine y col. (2011) en el cual el ganado libre de VLB y vacunado contra la bacterina J5 de *E.coli* produjo una cantidad significativamente mayor de IgG2 sérica específica de antígeno, en comparación los animales infectados con el retrovirus. Más recientemente en el trabajo realizado por Frie y col. (2016), tras la vacunación contra BoHV-1, los bovinos VLB+ produjeron menores títulos de anticuerpos, particularmente IgG2 contra dicho virus, en comparación con el ganado libre de VLB. A su vez, los niveles altos de IgG2 pueden explicar por qué no existieron diferencias significativas en el análisis de los títulos de anticuerpos totales.

Si bien en su conjunto, el presente estudio no ha podido demostrar que las vaquillonas VLB+ fallaron en su respuesta a la vacunación en comparación con las VLB-, si se obtuvieron sugerencias de que este retrovirus puede reducir la inmunidad protectora y modificar perfiles de respuesta. Debido a la alta prevalencia de esta virosis en los rebaños lecheros de Uruguay, es esencial continuar estudiando las circunstancias por las cuales VLB afecta negativamente al sistema inmunológico de los animales infectados.

Junto al BoHV-1, el VDVB es otro de los patógenos que tienen gran impacto a nivel reproductivo en Uruguay, asociado a enfermedades y mortalidad en la industria ganadera. Según Guarino y col. (2008) la exposición al virus está difundida en los bovinos de carne de todo el país, con una seroprevalencia del 100% en los rodeos nacionales. Más recientemente, Maya y col. (2016) también encontraron que el 100% de los rodeos de su ensayo eran seropositivos, revelándose que VDVB-1 (VDVB-1a, VDVB-1i) es el genotipo encontrado con mayor frecuencia en el país, seguido por VDVB-2 (VDVB-2b). Dentro de este marco de antecedentes, en el presente trabajo se obtuvo una seroprevalencia contra VDVB de 97,6%, y esta alta proporción de animales positivos se puede asociar a una exposición directa al virus, dada probablemente por la presencia de animales PI en el grupo en estudio. El mismo representó el 0,2% de rodeo, encontrándose dentro de los valores esperados para la prevalencia de animales PI, donde según Newcomer y col. (2017), pueden llegar a ser menores al 1%. La identificación y eliminación de estos bovinos es esencial en los planes de control contra la DVB, pues significan una fuente de infección muy importante para la perpetuación del virus en el rodeo (Lindberg y Houe, 2005), eliminando entre 1 y 10 millones de partículas virales infecciosas por mililitro de fluido corporal por día (Pecora y Pérez Aguirreburualde, 2017). Debido a esto, para la identificación del animal PI se utilizó un ELISA directo en dos muestras separadas en el tiempo (día 0 y 30), evidenciándose la presencia del antígeno viral en ambos casos, lo cual descartó el curso de una infección aguda transitoria. Luego se realizó la confirmación, dado que en ninguno de los sangrados post-vacunación el animal desarrolló anticuerpos contra VDVB, por su condición inmunotolerante (Hanon y col., 2012).

La recomendación en este caso, en base al éxito de planes nacionales obligatorios en países donde la DVB es endémica (Moennig y col., 2005; Houe y col., 2006; Presi y col., 2011), es la eliminación del animal PI. En este sentido es interesante mencionar la estrategia del programa nacional irlandés de erradicación de la DVB, donde ha sido obligatorio para todos los terneros recién nacidos el análisis mediante el llamado “modelo suizo” de antígeno en tejido (método directo). Con ello, tras su identificación y eliminación, se logró disminuir sustancialmente la incidencia de animales PI (Thulke y col., 2018). Actualmente en Uruguay esta arista dentro de los métodos de control para la DVB se aplica de forma voluntaria, pero sería conveniente poder implementar un marco legal para su obligatoriedad, pudiéndose establecer así un manejo eficaz de la enfermedad. Para tal efecto sería útil una investigación previa en relación con la prevalencia nacional de animales PI, así como de las capacidades económico/humanas para llevar a cabo el control por las vías mencionadas.

En paralelo, otro de los métodos mundialmente utilizados en el control de la DVB es la vacunación. En la actualidad, tanto vacunas vivas modificadas como inactivadas se encuentran disponibles contra el VDVB, a menudo combinadas con otros agentes virales y/o bacterianos, como es el caso de la vacuna utilizada en el presente ensayo. La vacunación del

ganado en edad reproductiva, manejo aplicado en esta investigación, previene la incidencia de abortos, así como la viremia y consecuente transmisión transplacentaria, que puede derivar en el nacimiento de crías PI. Esto último, si bien se considera uno de los objetivos más importantes de la vacunación, es más difícil de lograr que la prevención de la enfermedad clínica (Newcomer y col., 2017b).

En este contexto, la eficacia vacunal cobra vital importancia en los sistemas productivos. En efecto, los resultados del presente estudio indican una ausencia de respuesta a la inmunización contra el VDVB. De manera similar, en un trabajo donde se evaluó la respuesta serológica contra el VDVB inducida por vacunas comerciales del mercado brasilero, Anziliero y col. (2014) demostraron que cuatro vacunas no indujeron respuesta serológica neutralizante contra VDVB-1 en ningún animal, y una de ellas sólo en un animal (9%). Por su parte, cinco vacunas no indujeron anticuerpos contra VDVB-2 en ningún animal, y una de las mismas sólo en dos animales (20%). Más recientemente, en un trabajo publicado por Merchioratto y col. (2020), se evaluaron las respuestas serológicas inducidas por cuatro vacunas comerciales inactivadas de origen uruguayo, y solo una de ellas demostró producir títulos de anticuerpos neutralizantes moderados contra VDVB-1 y -2. En virtud de ello, se puede constatar que la variabilidad del virus y la existencia de tipos antigénicos distintos (Ridpath, 2005), con deficiente nivel de reactividad cruzada, significan uno de los obstáculos para el éxito en los planes de vacunación. Si bien el uso de vacunas monovalentes genera la producción de anticuerpos neutralizantes a antígenos virales heterólogos, como pudieron demostrarlo Kelling y col. (2007), generalmente la protección homóloga es superior (Fulton y col., 2003; van Campen y col., 2000). En un estudio realizado por Sozzi y col. (2020) se confirmó una mínima reacción cruzada entre los subgenotipos 1a y 1b del VDVB. En Uruguay las vacunas más utilizadas acusan tener ambas cepas, sin especificar subgenotipos. Por lo tanto, la elección de una vacuna debería basarse en estos aspectos epidemiológicos, para lograr mejores resultados. En efecto, la aplicación de vacunas polivalentes, involucrando tanto diferentes genotipos como subgenotipos, sería de utilidad. En un meta-análisis llevado a cabo por Newcomer y col. (2015) se llegó a concluir que vacunas polivalentes demostraron ser más eficaces en la protección contra la infección fetal y la prevención del aborto, en comparación con aquellas monovalentes. Por lo tanto, este tipo de productos son más recomendables a fin de proporcionar máxima cobertura contra una potencial variedad de cepas de desafío.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta al momento de evaluar la respuesta a la vacunación es si se trata de productos inactivados o a virus vivo modificado. En el presente estudio se utilizó una vacuna inactivada, conteniendo antígeno viral incapaz de replicarse. Ello condujo invariablemente a que se redujeran los riesgos adversos asociados a la vacunación, pero también se vio limitada la capacidad inmunógena de la vacuna, produciéndose anticuerpos dirigidos principalmente a proteínas estructurales, como E2, tal como Griebel (2015) describe en sus estudios. Si bien esto se pudo ver compensado, como se fue realizado en esta investigación, con la aplicación de una doble dosis (al día 0 y un booster al día 30), de todos modos, no se alcanzaron los niveles de anticuerpos protectores en el lote en estudio. Una alternativa a esta problemática podría ser la utilización de vacunas a virus vivo modificado, que son capaces de estimular más rápidamente la producción de niveles más altos de anticuerpos, al igual que la inmunidad mediada por células. Esto ha sido comprobado por diversos autores, como Brock y col. (2007), quienes determinaron que la protección estuvo presente tan pronto como 5 días luego de la vacunación con una única dosis contra VDVB-2

de vacuna viva modificada. De todos modos, debiera tenerse en cuenta que estos productos son menos seguros al momento de evitar la infección y sus consecuencias reproductivas en hembras gestantes. Se trata vacunas que simulan de mejor manera una infección natural, generando la producción de anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales del VDVB, expresadas durante la replicación en células infectadas. Las proteínas no estructurales se asocian a regiones altamente conservadas en los diferentes genotipos de VDVB, lo cual representaría una ventaja frente a la variabilidad de estos virus. A pesar de sus beneficios, las vacunas a virus vivo modificado aún no se encuentran autorizadas para su uso en Uruguay.

Debido a los resultados presentados en este estudio, se puede afirmar que la vacuna utilizada no indujo una respuesta serológica con la magnitud deseada en el lote de animales estudiado. En efecto, es importante revisar de manera periódica las formulaciones y composición de los productos comerciales que se utilizan contra el VDVB. Esta carencia de respuesta puede estar dada por la falta de parámetros específicos para la producción de vacunas en Uruguay, si se tiene en cuenta que los factores de manipulación y almacenamiento fueron adecuados al momento de la vacunación. La concentración de antígeno y adyuvante pueden afectar directamente la respuesta inmune en lo bovinos y probablemente sean las fallas principales en la formulación de vacunas (Silva y col., 2007b; Anziliero y col., 2014).

Por otra parte, es interesante mencionar que, en virtud de los resultados obtenidos con respecto a la seroprevalencia por un lado (animales seropositivos contra VDVB al inicio del ensayo, aún cuando el rodeo se declaró sin vacunación), y por el otro, a la respuesta a la vacunación (grupo de animales libres de VDVB al inicio del ensayo, no respondió a la misma), no fue posible determinar si existen diferencias en la respuesta inmune generada en vaquillonas VLB+ con respecto a las VLB-. Es necesario continuar investigando al respecto, asegurando animales negativos al VDVB al inicio de los ensayos, a pesar de que, según la experiencia en nuestro grupo de trabajo, significa una dificultad en Uruguay encontrar rodeos libres de esta infección. La utilización de vacunas de subunidades podría brindar la posibilidad de diferenciar entre animales vacunados e infectados, como fue demostrado por el estudio desarrollado por Pecora y col. (2012). Otra alternativa a ello podría ser la utilización durante el ensayo, de técnicas diagnósticas capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos generados en infecciones naturales.

Para finalizar, es interesante hacer mención del grupo de animales seronegativos al inicio del ensayo (2,4%). Se trata de bovinos que, si bien no presentaron infección natural, más allá de la presencia de un animal PI en el rodeo, tampoco respondieron a la vacunación. Ello nos permite cuestionarnos si existe alguna condición propia que los hiciera resistentes a la infección contra el VDVB. Al respecto, se conoce que la glucoproteína de membrana CD46 es utilizada por el VDVB como plataforma para la unión a células bovinas (Maurer y col., 2004) y está demostrada la variabilidad del ligando específico de dicha glucoproteína para el virus (llamado CCP1), existiendo versiones alélicas con unión significativamente menor al VDVB (Zezafoun y col., 2011). En este sentido, según Alzamel y col. (2016), la versión soluble de CD46 (sCD46), presumiblemente tiene capacidad de inhibir la unión al VDVB, lo que sugiere que el ganado naturalmente podría controlar de manera parcial la propagación hematogena del virus. La concentración de sCD46 en suero podría afectar la resistencia o

susceptibilidad de un animal individual a la enfermedad asociada con la infección por el VDVB.

11 CONCLUSIONES

Los datos del presente estudio indican que no se obtuvieron diferencias significativas en la respuesta inmune humoral total generada por la vacunación contra BoHV-1, entre animales infectados con VLB y aquellos sin el retrovirus. Igualmente, al evaluar la respuesta de anticuerpos diferencial por isotipos, animales VLB+ desarrollaron mayor cantidad de IgG1 30 dpv en comparación con aquellos VLB-.

En relación con el VDVB, en este ensayo se pudo evidenciar la presencia de animales persistentemente infectados en el rodeo, importante elemento considerado de riesgo que se vincula a la protección insuficiente inducida por las vacunaciones contra este virus, y lo cual explica en parte, la amplia difusión de la DVB a pesar de su utilización. En tal sentido, se encontró una seroprevalencia de 97,6% para el VDVB.

12 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abdala A., Alvarez I., Brossel H., Calvinho L., Carignano H., Franco L., Gazon H., Gillissen C., Hamaidia M., Hoyos C., Jacques J. R., Joris T., Laval F., Petersen M., Porquet F., Porta N., Ruiz V., Safari R., Suárez Archilla G., Willems L. (2019) BLV: Lessons on vaccine development. *Retrovirology* 16(1): 1–6.
2. Ackermann M. & Engels M. (2006) Pro and contra IBR - eradication. *Vet. Microbiol.* 113: 293-302.
3. Alonzo P., Benavides U., Isnardi F., Puentes R., Carol H., Clavijo A., Del Campo R., Bonnevaux J., Weiblen R., Fondevila N., Romera S., Sadir A., Maisonnave J (2002) Caracterización de un herpesvirus 1.1 (HVB-1.1) aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria* 37: 15–22.
4. Alonzo P. (2010) Herpesvirus bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección. Tesis de Maestría en salud animal. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 53p.
5. Alonzo P., Puentes R., Benavides U., Iznardi F., García R., Piaggio J., Maisonnave J. (2012) Effect of Bovine herpesvirus 1 infection on pregnancy rate of beef cows in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48(186): 5-12.
6. Alzamel N., Bayrou C., Decreux A., Desmecht D. (2016) Soluble forms of CD46 are detected in *Bos taurus* plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 49: 39-46.
7. Anziliero D., Martins M., Weiss M., Monteiro F. L., Ataide C. F., Weiblen R., Flores E. F. (2014) Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciencia Rural* 45(1): 58–63.
8. Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K. (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection, *Vet. Microbiol.* 53: 31–42.
9. Bacon L.D. (1987) Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. *Poult. Sci.* 66: 802–11.
10. Ballagi-Pordany A., Klintevall K., Merza M., Klingeborn B., Belak S. (1992) Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. (B)* 39: 69-77.
11. Barbosa V. M., Gondim C. C., Nasciutti N. R., Oliveira P. M., Alfieri A. A., Fritzen J. T., Headley S.A., Saut A.M., Berssaneti F.T., Saut J. P. (2019) Fatores de risco associados à infecção viral (BoHV-1 e BVDV) em rebanhos leiteiros mestiços com problemas reprodutivos, no município de Uberlândia. MG. *Arq. bras. med. vet. zootec.* 71(4): 1243-1250.
12. Barez P., de Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G., Hamaidia M., Jacques J., Perike S., Sriramareddy S., Renotte N., Staumont B., Reichert M., Trono K., Willems L. (2015) Recent Advances in BLV Research. *Viruses* 7(11): 6080-6088.
13. Barlett 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. *J. Dairy Sci.* 96: 1591–1597.
14. Barlett P.C., Sordillo L.M., Byrem T.M., Norby B., Grooms D.L., Swenson C.L., Zalucha J., Erskine R.J. (2014) Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *JAVMA* 244 (8): 914-922.

15. Barrios C.N., Rensetti D.E., Revelli G.R., Ceriani M.C., Trabattoni E., Esteban E.N., Juliarena M.A. (2012) En 2012, al norte del paralelo 34° S, el virus de la leucosis bovina infectaría más del 99% de los tambos con endemias en rodeos de carne. XXXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, Argentina (Córdoba), 4-7 de diciembre de 2012. Disponible en: https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=23983&inst=yes&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1635143 Fecha de consulta: 18/07/2020.
16. Baruta D.A., Ardoino S.M., Brandan J.L., Sosa R.E., Mariani E. L., Albretch E.M. (2011) Leucosis Bovina Enzoótica. *Ciencia Veterinaria* 13 (1): 8p.
17. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Dargatz D.A. (2017) Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. *J Vet Diagn Invest.* 29(5): 704-706.
18. Bendixen H.J. (1963) Preventive measures in cattle leukemia: Leukosis Enzoótica bovis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 108: 1241-1267.
19. Biswas S., Bandyopadhyay S., Dimri U., Patra, P.H. (2013) Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Q.* 33(2): 68-81.
20. Blagitz M. G., Souza F. N., Batista C. F., Azevedo L. F. F., Sanchez E. R., Diniz S. A., Della Libera A. M. M. P. (2017) Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Research in veterinary science* 114: 109-116.
21. Brackenbury L.S., Carr B.V., Charleston B. (2003) Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol* 96: 337-344.
22. Brasseur R., Cornet B., Burny A., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M. (1988) Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *Aids. Res. Hum. Retrovir.* 4: 83-90.
23. Brock K.V., Widel P., Walz P., Walz H.L. (2007) Onset of protection from experimental infection with type 2 bovine viral diarrhoea virus following vaccination with a modified-live vaccine. *Vet. Ther.* 8: 88-96.
24. Brown F. (1989) The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada 1987. *Intervirology* 30: 181-186.
25. Buehring G.C., Shen H.M., Jensen H.M., Jin D.L., Hudes M., Block G. (2015) Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PloS one* 10(9): e0134304.
26. Buehring G. C., Shen H. M., Schwartz D. A., Lawson J. S. (2017) Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PloS one* 12(6): 1-12.
27. Burny A. (1996) Comparative approach to retroviral vaccines. *Aids. Res. Hum. Retrovir.* 12(5): 389-392.
28. Buxton B.A., Hinkle N.C., Schultz R.D. (1985) Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am. J. Vet. Res.* 46: 123-126.
29. Byrne A.W., Guelbenzu-Gonzalo M., Strain S.A.J., McBride S., Graham J., Lahuerta-Marin A., Harwood R., Graham D.A., McDowell S. (2017) Assessment of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and *Mycobacterium bovis*: A herd-level risk factor analysis from Northern Ireland. *Prev Vet Med.* 141: 38-47.

30. Camargos M.F., Feliziani F., De Giuseppe A., Lessa L.M., Reis J.K.P., Leite R.C. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 102: 169-173.
31. Carvalho A., Almeida J.C., Guimarães L., Estanislao P., Freitas J.C., Santos C. (1998) Anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina em animais da raça leiteira importados do Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Gaúcha* 4: 35-38.
32. Chamizo E.G. (2005) Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *REDVET*. VI (7): 2-25.
33. Corredor-Figueroa A. P., Salas S., Olaya-Galán N., Quintero J. S., Fajardo Á., Soñora M., Moreno P., Cristina J., Sánchez A., Tobón J., Ortiz D., Gutiérrez M. F. (2020) Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. *Infection, Genetics and Evolution* 80: 104171.
34. 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: 02/01/2020.
35. Dias R.K., Cargnelutti J.F., Weber M.N., Canal C.W., Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. (2017) Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 203: 221–228.
36. DiGiacomo R.F. (1992) Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet. Med.* 87(3): 263-271.
37. d'Offay J.M., Eberle R., Fulton R.W., Kirkland P.D. (2016) Complete genomic sequence and comparative analysis of four genital and respiratory isolates of bovine herpesvirus subtype 1.2b (BoHV-1.2b), including the prototype virus strain K22. *Arch Virol.* 161(11): 3269-74.
38. Dubovi E.J. (1996) Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Med.* 91: 867–872.
39. Engels M. y Ackermann M. (1996) Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 53: 3-15.
40. 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. *Vet. Med. Intern.* 3: 915747.
41. Erskine R.J., Bartlett P.C., Byrem T.M., Render C.L., Febvay C., Houseman J.T. (2012) Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 95: 727-734.
42. Estes D. M., Brown W. C. (2002) Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 90(1-2): 1-10.
43. Fechne H., Blankenstein P., Looman A.C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., Kurg A., Beber D., Marquardt O., Ebner D. (1997) Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virol.* 237: 261-269.
44. 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. *Arch. Med. Vet.* 38 (2): 137-141.
45. Fischer S. (2012) Análisis del genoma completo de la leucosis bovina obtenido a partir de un linfosarcoma. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR. 78p.

46. Flores E.F., Weiblen R., Oliveira C., Kreutz L.C. (1992) Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soros de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *A Hora Veterinária* 12: 5-8.
47. Flores E.F. y Donis R. (1995) Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virology* 208: 565-575.
48. Florins A., Gillet N., Asquith B., Boxus M., Burteau C., Twizere J.C., Urbain P., Vandermeers F., Debaq C., Sanchez-Alcaraz M.T., Schwartz-Cornil I., Kerkhofs P., Jean G., Thewis A., Hay J., Mortreux F., Wattel E., Reichert M., Burny A., Kettmann R., Bangham C., Willems L. (2007) Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front. Biosci.* 12: 1520-1531.
49. Frie M.C., Coussens P.M. (2015) Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163: 103-114.
50. Frie M., Sporer K., Wallace J., Maes R., Sordillo L., Bartlett P., Coussens P., (2016) Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 182: 125–135.
51. Frie M.C., Sporer K.R.B., Benitez O.J., Wallace J.C., Droscha C.J., 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. *Vet Sci* 4: 112.
52. Fredriksen B., Sandvik T., Loken T., Odegaard S.A. (1999) Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus. *Vet. Rec.* 144: 111-114.
53. Fukuyama S., Kodama K., Hirahara T., Nakajima N., Takamura K., Sasaki O., Imanishi J. (1993) Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 99-106.
54. Fulton R.W., Ridpath J.F., Confer A.W., Saliki J.T., Burge L.J., Payton M.E., (2003) Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* 31: 89–95.
55. Furtado A. (2016) Detección de herpes virus bovino tipo 1 y 5 en ganglios trigéminos en el Uruguay. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 67p.
56. Gil A., Sienna R., Guarino H., Piaggio J., Arrillaga C. (2000) Sistema de monitoreo en Salud Animal: Primera experiencia en ganado lechero en el Uruguay. XXI Congreso Mundial de Buiatría. Uruguay (Paysandú), 4-8 de diciembre de 2000, p 122.
57. 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.
58. Giovanna M., Ulloa J.C., Uribe A.M., Guitierrez M.F. (2013) Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. *Open Jour. Med. Microbiol.* 3(1): 84-90.
59. Glew E.J., Carr B.V., Brackenbury L.S., Hope J.C., Charleston B., Howard C.J. (2003) Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J. Gen. Virol.* 84: 1771-80.

60. Grau M. A., y Monti G. (2010) Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42(2): 87–91.
61. Griebel P. J. (2015) BVDV vaccination in North America: Risks versus benefits. *Animal Health Research Reviews* 16(1), 27–32.
62. Guarino H., Maisonnave J., Capano F., Pereira J., (1982) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina en Uruguay. *Veterinaria* 78: 131–134.
63. Guarino H., Núñez A., Repiso M. V., Gil A., y Dargatz D. A. (2008) Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev. Vet. Med.* 85(1–2): 34–40.
64. Gutiérrez G. (2010) Estudio de la dinámica de la infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalencia. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 165p.
65. Gutierrez G., Rodriguez S.M., de Brogniez A., Gillet N., Golime R., Burny A., Jaworski J.P., (2014a) Vaccination against retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses* 6: 2416-2427.
66. Gutiérrez G., Alvarez I., Merlini R., Rondell F., Trono K. (2014b) Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Vet. Res.* 10: 2416–2427.
67. Gutiérrez S.E., Esteban E.N., Lützelschwab C.M., Juliarena M.A. (2017) Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection. *Trends and Advances in Veterinary Genetics* 6: 101-126.
68. Gutiérrez S. E., Lützelschwab C. M., Barrios C. N., y Juliarena M. A. (2020) Bovine Leukosis: an updated review. *Rev Inv Vet Perú* 31(3): 1–28.
69. Guy J.S. y Potgieter L.N.D. (1985) Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J. Vet. Res.* 46: 893-898.
70. Hanon J.B., Van der Stede Y., Antonissen A., Mullender C., Tignon M., Van denBerg T., Caij B. (2012) Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (BVD) control programme: appropriate interpretation of real-time RT-PCR and antigen-ELISA test results. *Transbound. Emerg. Dis.* 61(2): 156–162.
71. Hopkins S.G., DiGiacomo R.F. (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13(1): 107-128.
72. Houe H. (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3): 521-47.
73. Houe H., Lindberg A. y Moennig V. (2006) Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 427–436.
74. Iwan E., Szczotka M., Kocki J. (2017) Cytokine profiles of dendritic cells (DCs) during infection with bovine leukaemia virus (BLV). *Pol. J. Vet. Sci.* 20: 221-231.
75. Juliarena M. A., Gutierrez S. E., y Ceriani C. (2007) Determination of proviral load in bovine leukemia virus. *AJVR* 68 (11): 1220-1225.
76. Juliarena M. A., Barrios C. N., Ceriani M. C., y Esteban E. N. (2016) Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* 99(6): 4586–4589.

77. Juliarena M. A., Barrios C. N., Lützel Schwab C. M., Esteban E. N., y Gutiérrez S. E. (2017) Bovine leukemia virus: Current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment* 9: 13-26.
78. Kabeya H., Ohishi K., Ohashi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. (1996) An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine* 14: 1118-1122.
79. Kabeya H., Ohashi K., Onuma M. (2001) Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63(7): 703-708.
80. Kelling C.L., Hunsaker B.D., Steffen D.J., Topliff C.L., Eskridge K.M. (2007) Characterization of protection against systemic infection and disease from experimental bovine viral diarrhea virus type 2 infection by use of a modified-live noncytopathic type 1 vaccine in calves. *Am. J. Vet. Res.* 68: 788–796.
81. Kendrick J.W., McEntee K. (1967) The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. *Cornell Vet.* 57: 3-11.
82. Konnai S., T. Usui, K. Ohashi, and M. Onuma (2003) The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 94: 283-294.
83. Lairmore M.D. (2014) Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: insights in transmission and pathogenesis. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2: 189–208.
84. Lanyon S.R., Hill F.I., Reichel M.P., Brownlie J. (2014) Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet. J.* 199: 201–209.
85. Larghi M. (2018) Comparative study in the control of bovine viral diarrhea. *Anim. Health Res. Rev.* 19(2): 125-133.
86. Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. (2018) Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46: D708–D717.
87. Lindberg A., y Houe H. (2005) Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72: 55–73; discussion 215-219.
88. Lüchter F. (2004). Enfermedades crónicas. En Lüchter F. *Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. Enfermedades infecciosas de los Rumiantes.* Buenos Aires, Editorial Universitaria de la Patagonia, 123-143.
89. Luciw P., Leung N. (1992) Mechanisms of Retrovirus Replication. En: Luciw P., Leung N. *The Retroviridae.* New York, Plenum, 159-298.
90. Lundberg P. y Splitter G.A. (2000) gammadelta (+) T-Lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. *J. Virol.* 74: 8299-8306.
91. Manet G., Guilbert X., Roux A., Vuillaume A., Parodi A. L. (1989) Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22 (3): 255-263.
92. Marshak R.R. (1968) Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 243-263.
93. Martín D., Arjona, A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gómez-Lucía E. (2001) Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J. Vet. Méd.* 48: 97-106.
94. Maurer K, Krey T., Moennig V., Thiel H.J., Rumenapf T. (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 78: 1792–1799.

95. Maya L., Puentes R., Reolón E., Acuña P., Riet F., Rivero R., Cristina J., Colina R. (2016) Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 161: 529–535.
96. Mechor G.D., Rousseaux C.G., Radostits O.M., Babiuk L.A., Petrie L. (1987) Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can. J. Vet. Res.* 51: 452–459.
97. Mederos A. e 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. Uruguay (Paysandú) 18, 19-20 de junio de 1998. 19-20.
98. Merchioratto I., Aurélio A. D. A., Villela J. M., Stone N. V., Roman I. J., Traesel C. K., Brum M. C. S. (2020) Immunogenicity in sheep of Uruguayan commercial vaccines against bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. *Ciência Rural*, 50(4).
99. Metzler A.E., Matile H., Gassman U., Engels M., Wyler R. (1985) European isolates of bovine herpesvirus-1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 85(1-2): 57-69.
100. Miller J.M., Van Der Maaten M.J. (1978) Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 9: 871-877.
101. Miller J.M., van der Maaten M.J. (1985) Effect of primary and recurrent infections bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1434-1437.
102. Miller J.M., van der Maaten M.J. (1986) Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.* 47: 223-228.
103. Miller J.M., van der Maaten M.J. (1987) Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1555-1558.
104. Miller J.M., Whetstone C.A., Van der Maaten M.J. (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 52(3): 458-61.
105. Mionetto M. y Rodríguez A. (2018). Asociación entre leucosis bovina enzoótica y la respuesta inmune humoral natural contra enfermedades infecciosas de interés reproductivo. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR. 49p.
106. Moerman A., Straver P.J., de Jong M.C., Quak J., Baanvinger T., van Oirschot J.T. (1993) A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132(25): 622-6.
107. Moennig V., Liess B. (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3): 477-87.
108. Moennig V., Eicken K., Flebbe U., Frey H.R., Grummer B., Haas L., Greiser-Wilke I., y Liess B. (2005) Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev. Vet. Med.* 72: 109–114; discussion 215-109.
109. Moennig V., Becher P. (2015) Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? *Anim. Health. Res. Rev.* 16(1): 83-7.

110. Monti G.E., Frankena K., De Jong M.C.M. (2007) Evaluation of Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus within Dairy Herds of Argentina. *Epidemiol. Infect.* 135 (2): 228-237.
111. Moratorio G. (2012). Aspectos genómicos y evolutivos del Virus de la Leucosis Bovina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UdelaR. 253p.
112. Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., y Thiry E. (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38(2): 181–209.
113. NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations (2007) Disponible en:
http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf Fecha de consulta: 18/07/2020.
114. Nekouei O., VanLeeuwen J., Stryhn H., Kelton D., Keefe G. (2016) Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 133: 1-9.
115. Newcomer B. W., Walz P. H., Givens M. D., y Wilson A. E. (2015) Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis. *Theriogenology* 83(3): 360-365.
116. Newcomer B.W., Cofield L.G., Walz P.H., Givens M.D. (2017a) Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 138: 1–8.
117. Newcomer B. W., Chamorro M. F., y Walzy P. H. (2017b) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 206: 78–83.
118. Nieto Farias M.V., Souza F.N., Lendez P.A., Martínez-Cuesta L., Santos K.R., Della Libera A.M.M.P., Ceriani M.C., Dolcini G.L. (2018) Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 206: 41-48.
119. Norby B., Bartlett P.C., Byrem T.M., Erskine R.J. (2016) Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99: 2043-2052.
120. Odeón A.C., Leunda M.R., Faverín C., Boynak N., Vena M.M., Zabal O. (2009) In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Revista Argentina de Microbiología* 41(2): 79–85.
121. Onuma M., Hodatsu T., Yamamoto S., Higashihara M., Masu S., Mikami T., Izawa H. (1984) Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1212-1215.
122. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE (2019). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2019. Sección 3.4.7 / 3.4.9 / 3.4.11 Disponible en: <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/> Fecha de consulta: 02/01/2020.
123. Ooshiro M., Konnai S., Katagiri Y., Afuso M., Arakaki N., Tsuha O., Murata S. y Ohashi K. (2013) Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet. Rec.* 173: 527.
124. Ott S.L., Johnson R., Wells S.J. (2003) Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 61: 249-262.

125. Pacífico C., Santangelo F., Sabatini D. (2013) Por IBR y DVB, se pierden más de \$812 millones al año. Seminario de sustentabilidad y modernización de la ganadería. Programa de Agronegocios de la UBA, Universidad de Lomas de Zamora y Fundación Gestión y Estrategia Agraria (GEA). Argentina (Buenos Aires).
126. Panei C. J., Larsen A. E., Fuentealba N. A., Metz G. E., Echeverría M. G., Galosi C. M., Valera A. R. (2019) Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. *Open Vet. J.* 9(1): 33–37.
127. Pecora A., Aguirreburualde M. S. P., Aguirreburualde A., Leunda M. R., Odeon A., Chiavenna S., Levy, S. M. (2012) Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Vet Res. Comm.* 36(3): 157-164.
128. Pecora A., Pérez Aguirreburualde M.S., Malacari D.A., Zabal O., Sala J.M., Konrad J.L., Caspe S.G., Bauermann F., Ridpath J., Dus Santos M.J. (2016) Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *J. Vet. Diagnost. Invest.* 29(6): 926–929.
129. Pecora y Pérez Aguirreburualde (2017). Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. En https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-actualizacion_en_diarrea_viral_bovina.pdf Fecha de consulta: 29/10/2020.
130. Pedrera M., Sanches Cordón P. J., Risalde M. A., Molina V., Ruiz-Villamor E., Gómez-Villamandos J. C. (2008) Respuesta inmunitaria en la diarrea vírica bovina. *Anales Real Academia Ciencias Veterinarias* 21(1): 85–104.
131. Peterhans E., Jungi T.W., Schweizer M. (2003) BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107-112.
132. Petersen M. I., Alvarez I., Trono K. G., Jaworski J. P. (2018) Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction. *J. of Dairy Sci.* 101(7): 6366–6374.
133. Pidone C. L., Galosi C. M., Etcheverrigaray M. E. (1999) Artículo de Revisión HERPESVIRUS BOVINOS 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 19(2): 40–50.
134. Polat M., Takeshima S., Aida Y. (2017) Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology* 14: 209.
135. Pospíšil Z., Krejci J., Jinek P., Lany P., Zendulkova D., Cihal P. (1996) Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53 (1-2): 199-206.
136. Presi P., Struchen R., Knight-Jones T., Scholl S., Heim D. (2011) Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland –experiences of the first 2 years. *Prev. Vet. Med.* 99: 112–121.
137. Puentes R., Alonso P., Benavides U., Silva A. D., Esteves P. A., Roehe P. M., Maisonnave J. (2007) Primer aislamiento de Herpesvirus Bovino 1 Subtipo 2 (BoHV-1.2) en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 42: 9-13.
138. Puentes R., De Brun M.L., Algorta A., Alvarez J.P., Sacco G., Oliveira M., Llambí S. (2016a) Horizontal transmission dynamics of Bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected holstein heifers. *Sci Anim Health* 4(3): 294-309.
139. Puentes R., De Brun M.L., Algorta A., Da Silva V., Mansilla F., Sacco G., Llambí S., Capozzo A.V. (2016b) Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet. Res.* 12(1): 119.

140. Puentes R. (2016c). Epidemiología, diagnóstico y efecto de la presencia del virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en animales asintomáticos sobre parámetros productivos, reproductivos y sanitarios. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 53p.
141. 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), 6917-6921.
142. Radostitis O., Gay C., Hinchcliff K., Constable P. (2007) Disease associated with viruses and chlamydia I. En: Radostits O., Gay C., Hinchcliff K., Constable P. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses*, New York, Saunders Elsevier, 1209–1221.
143. Rama G., Meikle A., Puentes R., Moratorio G., Nicolini P., Pessina P., Furtado A., Pritsch, O. (2010) Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Veterinaria (Montevideo)* 46: 177-180.
144. Repiso M. V, Gil A., Fernandez L., Guarino H., Herrera B., Olivera M., Osawa T., Silva M. (2005) Prevalencia De Las Principales Enfermedades Infecciosas Que Afectan El Comportamiento Reproductivo En La Ganaderia De Carne Y Caracterización De Los Establecimientos De Cría Del Uruguay. *Fpta* 40(157): 5–28.
145. Richter V., Lebl K., Baumgartner W., Obritzhauser W., Käsbohrer A., Pinior B. (2017) A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. J.* 220: 80–87.
146. Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205: 66–74.
147. Ridpath J. (2005) Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* 72: 17–30.
148. Ridpath J.F., Fulton R.W., Kirkland P.D., Neill J.D. (2010) Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(2): 184–191.
149. Riet Correa F., Monesiglio M.C., Pritsch O. (2019) Leucosis enzoótica bovina en Uruguay: hacia dónde vamos?. XLVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Uruguay (Paysandú) 6-7 de junio de 2019. 51-53.
150. Ristau E., Beier D., Wittmann W. (1987) The course of infection with bovine leukosis virus (BLV) in calves after the administration of cell extract from lymph node tumors of BLV-infected cattle. *Arch. Exp. Vet. Med.* 41: 323-331.
151. Rivero R., Haedo F., Feola R., Capano F., Guarino H., Saizar J., Bermudez J. (1987) Granuloma nasal bovino: descripción de un caso colectivo y discusión sobre su probable etiología. *Veterinaria (Montevideo)* 98: 5-11.
152. Rodríguez S.M., Floris A., Gillet N., de Brogniez A., Sánchez-Alcaraz M.T., Boxus M, Boulanger F., Gutiérrez G., Trono K., Alvarez I., Vagnoni L., Willems L. (2011) Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses* 3: 1210-1248.
153. Roizman B., Carmicha L.E., Deinhardt F., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F Sheldrich P., Takahashi M., Wolf K. (1982) Herpes-viridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. *Intervirology* 16(4): 201-217.

154. Rola-Łuszczak M., Finnegan C., Olech M., Choudhury B., Kuźmak J. (2013) Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J. Virol. Methods.* 189(2): 258-64.
155. Romera S. A. (2001) Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus. Tesis de grado. Universidad de Buenos Aires. 158p.
156. Romero J.J., Dávila G., Beita G., Dolz G. (2015) Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agron. Costarricense* 39: 7-18.
157. Ruggiero V.J., Norby B., Benitez O.J., Hutchinson H., Sporer K.R.B., Droscha C., Swenson C.L., Bartlett P.C. (2019) Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J. Dairy Sci.* 102: 9165–9175.
158. Saizar J, Gil A. (1998) Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en rodeos de carne del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Uruguay (Paysandú) 18, 19-20 de junio de 1998. 10.
159. Santos G.R., de Oliveira J.M.B., Brandespim D.F., Oliveira A.A. da F., Mota R.A., Pinheiro Júnior J.W. (2013) Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 35(4): 371-377.
160. Schwartz I., Levy D. (1994a) Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.* 25(6): 521–536.
161. Schwartz I., Bensaid A., Polack B., Perrin B., Berthelemy M., Levy D. (1994b) In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* 68: 4589-4596.
162. Shettigara P.T., Samagh B.S., Lobinowich E.M. (1989) Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Can. J. Vet. Res.* 53: 108–110.
163. Silva L. F. D., Weiblen R., Flores, E. F. (2007a) Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Ciência Rural* 37(5): 1471-1474.
164. Silva L. F. D., Diel D. G., Cilento M. D. C., Weiblen R., Flores E. F. (2007b) Cobaias como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina. *Ciência Rural* 37(4): 1060-1065.
165. Silvera C., Fraga M. (2019) Virus de la leucosis bovina: un villano silencioso. *Revista INIA* 61: 37-41.
166. Silvestro C., Bratanich A. (2016) The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. *Arch. Virol.* 161(12): 3299-3308.
167. Smith D.B., Meyers G., Bukh J., Gould E.A., Monath T., Scott Muerhoff A., Pletnev A., Rico-Hesse R., Stapleton J.T., Simmonds P., Becher P. (2017) Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 98(8): 2106–2112.
168. Sordillo L.M., Hicks C.R., Pighetti M.G. (1994) Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 207(3): 268–73.

169. Sozzi E., Righi C., Boldini M., Bazzucchi M., Pezzoni G., Gradassi M., Moreno A. (2020) Cross-Reactivity Antibody Response after Vaccination with Modified Live and Killed Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVD) Vaccines. *Vaccines* 8(3): 374.
170. Spilki F.R., Franco A.C., Roehle P.M. (2012) Analysis of isotype-specific antibody responses to bovine herpesviruses 1.1 and 1.2a allows to estimate the stage of infection. *Brazilian Journal of Microbiology* 1: 586-593
171. Ståhl K., Benito A., Felmer R., Zuñiga J., Reinhardt G., Rivera H., Baule C., Moreno-López J. (2009) Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 29(1): 41–44.
172. Tikoo S., Campos M., Babiuk L. (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, Pathogenesis, and Control. *Adv. Virus Res.* 45: 191-223.
173. Tizard I. (2000) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Barcelona, Elsevier, 574p.
174. Thulke H. H., Lange M., Tratalos J. A., Clegg T. A., McGrath G., O’Grady L., More S. J. (2018). Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. *Prev. Vet. Med.* 150: 151-161.
175. Trainin Z., Ungar-Waron H., Meiom R., Barnea A., Sela M. (1976) IgG and IgM antibodies in normal and leukaemic cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 86(4): 571-580.
176. Trono K.G., Perez-Filgueira D.M., Duffy S., Borca M.V., Carrillo C. (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* (3): 235–248.
177. Valle P.S., Skjerve E., Martin S.W., Larssen R.B., Østerås O., Nyberg O. (2005) Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* 72(1-2): 189-207.
178. Van Campen H., Vorpahl P., Huzurbazar S., Edwards J., Cavender, J. (2000) A case report: evidence for type 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *J. Vet. Diagn. Inv.* 12(3): 263-265.
179. van Duijn L., Veldhuis A.M.B., Mars M.H., de Roo B., Lam T.J.G.M. (2019) Efficacy of a voluntary BVDV control programme: Experiences from the Netherlands. *Vet J.* 245: 55-60.
180. Vanleeuwen J.A., Haddad J.P., Dohoo I.R., Keefe G.P., Tiwari A., Tremblay R. (2010) Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 94: 54-64.
181. Vargas D. S., Jaime J., Víctor y Vera, J. (2009) Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 22: 677–688.
182. Weber M.N., Silveira S., Machado G., Groff F.H.S., Mósena A.C.S., Budaszewski R.F., Dupont P.M., Corbellini L.G., Canal C.W. (2014) High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res.* 191: 117–124.
183. Wyler R., Engels M., Schwyzer M. (1989) *Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs*. Developments in veterinary virology ser. Kluwer Academic Publishers, Boston. 1-72.

184. Yang Y., Fan W., Mao Y., Yang Z., Lu G., Zhang R., Zhang H., Szeto C., Wang C. (2016) Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J. Dairy Sci.* 99: 3688-3697.
185. Yeşilbağ K., Alpay G., Becher P. (2017) Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses.* 9(6): 128.
186. Zaffaroni R., Piaggio J., Núñez A., de Freitas J., Suanes A., Cernicchiaro N., Gil (2007) Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica en la cuenca lechera sur del Uruguay. V Jornadas técnicas veterinarias, Uruguay, 150-151.
187. Zezafoun H., Decreux A., Desmecht D. (2011) Genetic and splice variations of *Bos taurus* CD46 shift cell permissivity to BVDV the bovine pestivirus. *Vet. Microbiol.* 152: 315–327.