

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN A ENFERMEDADES VIRALES
INMUNOSUPRESORAS Y LA REACTIVIDAD CONTRA *MYCOBACTERIUM
BOVIS*”**

por:

Renzo André GIORDANO FABRE

Enzo TRISTANT LEMA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Orientaciones: Medicina Veterinaria y Producción Animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

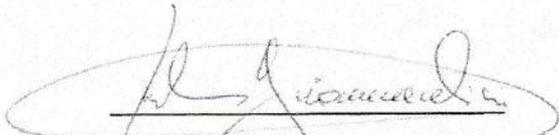
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

T6
965

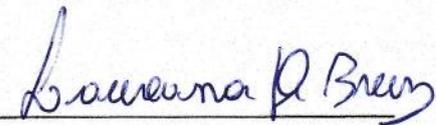
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

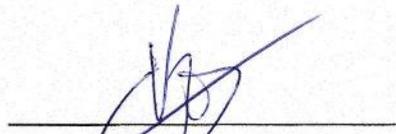
Presidente de mesa:
Nombre completo y firma


Dr. Edgardo Gianneechini

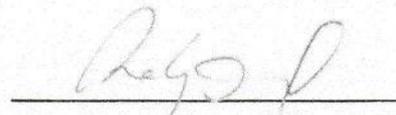
Segundo miembro (Tutor):
Nombre completo y firma


Dra. Laureana de Brun

Tercer miembro:
Nombre completo y firma


Dr. Keyin Yaneselli

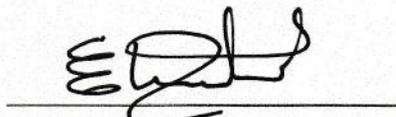
Cuarto miembro:
Nombre completo y firma


Dr. Rodrigo Puentes

Fecha:

18/12/2020

Autores:


Enzo Tristant Lema


Renzo André Giordano Fabre

520696 ginecología con libro PASGPAF 2021

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora, Dra. Laureana de Brun, por las incontables horas dedicadas a este trabajo, su continuo apoyo, disposición y voluntad para llegar al mejor resultado posible durante todos los años que dedicamos a este último escalón en nuestra formación profesional, guiándonos y estando siempre presente para nosotros.

A nuestro co-tutor, Dr. Rodrigo Puentes, por los consejos dados, el tiempo dedicado y la disposición que siempre tuvo hacia este trabajo, especialmente cuando más difícil parecía poder encontrar la forma de culminarlo.

A todo el personal del departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria, por permitirnos utilizar sus instalaciones y hacernos sentir como en casa en todo momento, siempre demostrando su apoyo y disposición.

Al personal de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por toda su ayuda y dedicación en la búsqueda de material bibliográfico.

Al establecimiento lechero, por permitirnos realizar este trabajo y su continua disposición.

A nuestras familias, por todo el apoyo que siempre tuvimos, por darnos la oportunidad de perseguir nuestros sueños y porque sabemos que nuestra felicidad y nuestros logros siempre van a ser también de ustedes.

A nuestros amigos y compañeros, por acompañarnos durante todos estos años.

A Camila y Eugenia, por siempre estar a nuestro lado, por las horas de compañía, el apoyo y la motivación que nos dieron.

A mi abuela Chuna, porque se todo lo que esto significa para vos.

A Sole, porque siempre vas a estar con nosotros.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	7
1. RESUMEN.....	8
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
4.1. INMUNOSUPRESIÓN.....	13
4.1.1. Enfermedades virales inmunosupresoras	13
4.2. TUBERCULOSIS	15
4.2.1. Definición	15
4.2.2. Etiología	15
4.2.3. Epidemiología	16
4.2.4. Patogenia	16
4.2.5. Respuesta inmune.....	17
4.2.6. Signos clínicos	18
4.2.7. Diagnóstico	19
4.2.8. Legislación Nacional	21
4.2.9. Tuberculosis bovina como zoonosis.....	22
4.3. LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA	24
4.3.1. Definición	24
4.3.2. Etiología	24
4.3.3. Epidemiología	25
4.3.4. Situación en Uruguay	25
4.3.5. Transmisión	26

4.3.6. Signos clínicos	27
4.3.7. Respuesta inmune.....	29
4.3.8. Diagnóstico	30
4.4. DIARREA VIRAL BOVINA.....	31
4.4.1. Definición	31
4.4.2. Etiología	32
4.4.3. Epidemiología	33
4.4.4. Situación en Uruguay.....	33
4.4.5. Transmisión	33
4.4.6. Signos clínicos	35
4.4.7. Respuesta inmune.....	37
4.4.8. Diagnóstico	38
5. HIPÓTESIS	40
6. OBJETIVOS	40
6.1. Objetivo general.....	40
6.2. Objetivos específicos.....	40
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
7.1. Caracterización del establecimiento.....	41
7.2. Toma de muestras	41
7.3. Detección de anticuerpos contra BLV mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)	42
7.4. Detección de anticuerpos contra DVB mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)	42
7.5. Detección de antígeno del vDVB mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	42
7.6. Hemograma.....	42
7.7. Elaboración de registros y análisis estadísticos	43
8. RESULTADOS.....	44

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Tablas

Tabla 1. Estatus serológico contra el Virus de Leucosis Bovina Enzoótica (BLV+/BLV-) y el Virus de Diarrea Viral Bovina (DVB+/DVB-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes. Página 44.

Tabla 2. Estatus leucocitario (Leucocitosis+/Leucocitosis-) y linfocitario (Linfocitosis+/Linfocitosis-) en relación al estatus serológico de Virus de Leucosis Bovina Enzoótica (BLV+/BLV-) expresado en valores absolutos y porcentajes. N= 224 (animales a los que se le realizó serología contra BLV y hemograma). Página 45.

Tabla 3. Estatus leucocitario (Leucocitosis+/Leucocitosis-) y linfocitario (Linfocitosis+/Linfocitosis-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes. N= 229 (animales a los que se le realizó PAC y hemograma). Página 45.

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la posible asociación existente entre la infección con el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV) y de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) con la presencia de animales positivos a la prueba anocaudal (PAC) para el diagnóstico de Tuberculosis Bovina (TB) en un establecimiento lechero del Uruguay. Se utilizaron 329 vacas Holando adultas en plena producción pertenecientes a un establecimiento ubicado el departamento de Florida, de las cuales 154 resultaron positivas y 175 resultaron negativas a la PAC. Se extrajeron muestras de sangre de la vena coccígea y se procesaron para poder realizar hemograma, enfocándose principalmente en los recuentos leucocitarios y linfocitarios, ELISA para detección de anticuerpos anti gp51 para el diagnóstico serológico de Leucosis Bovina Enzoótica, ELISA anti p80 para el diagnóstico serológico de Diarrea Viral Bovina y ELISA directo para el diagnóstico de Diarrea Viral Bovina en aquellos animales que resultaron negativos al ELISA anti p80. Se elaboraron registros y se realizó un análisis descriptivo de los datos mediante el empleo de Microsoft Excel y el posterior uso de la prueba de Chi²; resultando en que de 150 animales positivos a PAC, 109 (72,7%) presentaron anticuerpos contra BLV y 142 (94,7%) presentaron anticuerpos contra vDVB; mientras que de 174 animales negativos a PAC, 153 (87,9%) presentaron anticuerpos contra BLV y 168 (96,6%) presentaron anticuerpos contra vDVB; encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad a BLV y la reacción negativa a PAC ($p=0,000$). Por otro lado, se realizó hemograma y serología para BLV en 224 animales, resultando en que 111 animales (49,5%) presentaron linfocitosis en una única determinación, mientras que de los 176 animales que fueron seropositivos a BLV y se les realizó hemograma, 85 de ellos (48%) presentaron linfocitosis en una única determinación; y que de los 229 animales a los que se les realizó PAC y hemograma, 71 (31,0%) fueron positivos a PAC y presentaron linfocitosis mientras que 45 (19,7%) fueron negativos a PAC y presentaron linfocitosis, encontrándose aquí una asociación estadísticamente significativa entre la positividad a la PAC y la presencia de linfocitosis ($p<0,05$). A partir de los resultados obtenidos se concluyó que, bajo las condiciones de este estudio, no es posible afirmar que exista una asociación entre la infección por estas enfermedades virales inmunosupresoras y la reacción positiva a la PAC, siendo necesarios más estudios que se enfoquen en la temática.

2. SUMMARY

The objective of this work was to determine the possible association between the Enzootic Bovine Leukosis virus (BLV) and Bovine Viral Diarrhea virus (vDVB) infection and the presence of positive animals to the anocaudal test (PAC) for Bovine Tuberculosis (TB) diagnosis in a dairy farm in Uruguay. 329 adult Holando cattle in full production, belonging to an establishment located in Florida department, of which 154 were positive and 175 were negative to the PAC were used. Blood samples were extracted from the coccygeal vein and processed to perform a hemogram, focusing mainly on leukocyte and lymphocyte counts, ELISA for the detection of anti-gp51 antibodies for the serological diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis, anti-p80 ELISA for the serological diagnosis of Bovine Viral Diarrhea and direct ELISA for the diagnosis of Bovine Viral Diarrhea in those negative to anti-p80 ELISA animals. Records were kept and a descriptive analysis of the data was carried out using Microsoft Excel and the subsequent use of the Chi2 test; resulting in that from 150 animals positive for PAC, 109 (72.7%) presented antibodies against BLV and 142 (94.7%) presented antibodies against vDVB; while from 174 animals negative to PAC, 153 (87.9%) presented antibodies against BLV and 168 (96.6%) presented antibodies against vDVB; finding a statistically significant association between seropositivity to BLV and negative reaction to PAC ($p = 0.000$). On the other hand, hemogram and serology for BLV were performed in 224 animals, resulting in that 111 animals (49.5%) presented lymphocytosis in a single determination, while from the 176 animals that were seropositive for BLV and a blood count was performed, 85 of them (48%) presented lymphocytosis in a single determination; and that from the 229 animals that underwent PAC and blood count, 71 (31.0%) were positive for PAC and presented lymphocytosis while 45 (19.7%) were negative for PAC and presented lymphocytosis, finding here a statistically significant association between CAP positivity and the presence of lymphocytosis ($p < 0.05$). From those results obtained, it was concluded that, under the conditions of this study, it is not possible to affirm that there is an association between the infection by these immunosuppressive viral diseases and the positive reaction to PAC. Therefore, more studies that focus on this issue are needed.

3. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad inflamatoria crónica, infectocontagiosa de origen bacteriano, caracterizada por la formación de granulomas (Carrisoza-Urbina y col., 2019); que se encuentra presente a nivel mundial (Irureta, 2016) y que puede afectar a todos los vertebrados de sangre caliente (Gil, 2012). En la mayoría de los países en vías de desarrollo se trata de una enfermedad endémica, afectando principalmente al ganado lechero (Casal, 2016). El diagnóstico por la prueba de tuberculina anocaudal (PAC), que consta en una prueba de hipersensibilidad basada en la medición de la inflamación dérmica causada principalmente por la respuesta inmune celular, es la única prueba oficial aprobada dentro de nuestro país. Para finalmente diagnosticar la enfermedad, se identifica al animal y se notifica al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), el cual, mediante los Veterinarios Oficiales de División de Sanidad Animal, procede a realizar la prueba de tuberculina comparativa para confirmar y marcar a los animales positivos con una T en la quijada, quienes serán aislados y enviados directo a faena (Irureta, 2016).

La inmunosupresión es un estado de disfunción temporal o permanente del sistema inmunológico, resultando en una respuesta inmune inapropiada y un aumento en la susceptibilidad hacia los agentes patógenos (Dohms y Saif, 1984). En bovinos los virus son una de las causas más comunes de inmunosupresión en condiciones de campo. La inmunosupresión inducida por virus se manifiesta como alteraciones en la función de varias células, especialmente linfocitos y células mononucleares (Muneer, 1988). Dentro de las enfermedades virales inmunosupresoras en bovinos más prevalentes en nuestro país, se encuentran la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV) y la Diarrea Viral Bovina (DVB).

El virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV), perteneciente a la familia *Retroviridae* (ICTV, 2019a), es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo, presentando en Uruguay una prevalencia serológica en rodeos lecheros muy alta. La transmisión del BLV puede ser tanto vertical como horizontal, siendo esta última la principal vía de contagio (Hopkins y DiGiacomo, 1997). El 90% de los animales infectados son asintomáticos, tanto aleucémicos o con linfocitosis persistente (aumento en el recuento de linfocitos superior a tres desvíos estándar sobre la media en dos muestras analizadas separadas en el tiempo por un período de

60 – 90 días) (Bendixen, 1963; Marshak, 1968). El BLV lleva a grandes pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones importantes en el sistema inmune (Bartlett y col., 2013). La alteración del sistema inmune provocada por esta infección puede aumentar la incidencia de otras patologías, generando un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico (Trainin y Brenner, 2005).

En estados avanzados de la enfermedad, con presencia de tumores, el diagnóstico se puede realizar mediante examen clínico, biopsia y/o necropsia; pero en animales asintomáticos o que presentan linfocitosis persistente se requieren pruebas de laboratorio para poder realizarlo. Las técnicas de referencia empleadas en estos casos son la Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) (Felmer y col. 2006; Rama y col., 2010; OIE, 2018a).

Finalmente, la Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad causada por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* (ICTV, 2019) de distribución mundial y muy alta prevalencia en Uruguay (Saizar y Gil, 1998; Guarino y col., 2008), siendo la causa de una de las infecciones más importantes del ganado bovino debido a su alta prevalencia y a las grandes pérdidas económicas que genera (Houe, 1999; Richter, 2017). La infección por este virus causa un impacto económico importante causado principalmente por una disminución en la performance reproductiva del ganado incluyendo una disminución en el porcentaje de concepción, abortos y reducción en la producción lechera (Gethmann, 2019), sumado a su efecto inmunosupresor (Roth y col, 1981; Markham y Ramnarair, 1985; Tizard, 2000). La transmisión del virus de la DVB (vDVB) puede darse tanto de forma vertical como horizontal, por contacto directo o indirecto. La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos persistentemente infectados (PI), quienes eliminan el virus en todas sus excreciones y secreciones durante toda su vida (Houe, 1995).

La infección por el vDVB se presenta de una forma multifacética con cuadros clínicos variados. Se han descrito cuatro síndromes principales: infección aguda, infección intrauterina, infección persistente y enfermedad de las mucosas (Ramírez y col. 2012). La infección aguda puede causar una inmunosupresión en el animal, favoreciendo la aparición de otras enfermedades infecciosas, debido a que el vDVB actúa

disminuyendo las funciones inmunes asociadas principalmente con respuestas inmunes de tipo celular (Potgieter, 1995).

El diagnóstico de la infección por el vDVB puede ser complejo debido al lapso de tiempo entre la infección y el inicio de los signos clínicos. La detección de infecciones agudas y del vDVB en materiales reproductivos puede ser difícil, mientras que la detección de animales PI es relativamente más sencilla, mediante el uso de ELISA para detección de antígenos o RT-PCR (OIE, 2018b). Complementariamente, se pueden realizar pruebas serológicas como el ELISA (Lértora, 2003) y la inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección. Para esto se utilizan muestras pareadas de suero que se hayan tomado en la fase aguda y en la fase de convalecencia, dando lugar a una alta probabilidad de diagnosticar o excluir la infección por el vDVB (OIE, 2018b).

Las altas prevalencias de estas enfermedades virales en el país, el impacto económico que generan, y el estado de inmunosupresión que provocan en los animales el cual podría aumentar la probabilidad de que ellos se infecten con TB. Sumando la falta de estudios que relacionen estas tres enfermedades en el ganado bovino y las diversas publicaciones en donde se demuestra la existencia de una asociación entre la infección por un virus inmunosupresor como es el VIH y una mayor susceptibilidad a la tuberculosis humana (OMS, 2019), dan lugar a la hipótesis planteada de que los animales infectados con el BLV y/o expuestos al vDVB tienen una mayor probabilidad de reaccionar positivamente a la prueba de tuberculina utilizada para el diagnóstico de la TB y representan la importancia de este trabajo.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión es una condición caracterizada por una disfunción tanto a nivel celular como humoral de la respuesta inmune. Los defectos a nivel celular incluyen alteraciones en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células *natural killers* dentro de la inmunidad innata, y alteraciones en los linfocitos T y B dentro de la inmunidad adaptativa. Por otro lado, a nivel humoral la disfunción inmune puede deberse a alteraciones en el sistema del complemento, quimiocinas, citoquinas e inmunoglobulinas. Este estado de disfunción inmune determina una mayor susceptibilidad hacia los microorganismos patógenos (Elfaki y col, 2012). Los agentes inmunosupresores dañan los elementos del sistema inmune y llevan a una alteración del balance funcional protector e inmunomodulatorio del hospedador. La disfuncionalidad del sistema inmune de un animal puede tomar diferentes formas que pueden variar en grado, dirección y duración. Muchos términos como ablación inmune (anulación permanente de la respuesta inmune), inmunotolerancia (falta de respuesta inmunológica selectiva a un antígeno en particular), e inmunodepresión (fallo en la inmunocompetencia y reducción en la respuesta inmune ya desarrollada) han sido usados para identificar diferentes tipos de discapacidades en la función del sistema inmune. La inmunosupresión es definida como un estado de descenso en la respuesta inmune a todos los antígenos extraños, mientras que la inmunotolerancia es un estado de un descenso o no respuesta a un antígeno en particular (Muneer y col, 1988).

En animales, la inmunosupresión puede ser causada por agentes infecciosos o no infecciosos. Las causas infecciosas pueden ser bacterianas, virales o helmínticas, mientras que los factores no infecciosos incluyen químicos, hormonas, antibióticos y toxinas. Otros factores que están implicados en la inmunosupresión son: condición ambiental (temperatura, humedad, densidad poblacional y estrés) y la falta de ciertos nutrientes esenciales, como aminoácidos, vitaminas y minerales (Henken y col, 1983; Gross y Siegel, 1982; Muneer y col, 1988).

4.1.1. Enfermedades virales inmunosupresoras

En bovinos los virus son probablemente, junto con el stress, las deficiencias nutricionales y la edad avanzada, una de las causas más comunes de inmunosupresión en condiciones de campo (Tizard, 2000). La inmunosupresión

inducida por virus se manifiesta como alteraciones en la función varias células, especialmente linfocitos y células mononucleares (Muneer, 1988; Konnai y col, 2017). Ellos pueden causar un estado de inmunosupresión en el hospedero mediante una variedad de mecanismos, los cuales pueden ser clasificados en cuatro categorías. Primero, la inmunosupresión puede ser causada por los efectos directos de la replicación viral sobre la función de los linfocitos. Por otro lado, la actividad de factores solubles, como pueden ser distintos tipos de citoquinas, liberados por las células infectadas por el virus pueden llevar a este estado de disfunción inmune. Un tercer mecanismo por el cual los virus pueden causar inmunosupresión es la infección de los macrófagos, afectando la función de estas células tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Finalmente, la inmunosupresión puede ser resultado de un desequilibrio inmunológico causado por la actividad viral, llevando a una hiperactividad de las células T reguladoras supresoras de la respuesta inmune (Rouse y Horohov, 1986).

El BLV causa disturbios en el sistema tanto a nivel de la respuesta inmune innata como adaptativa (Pyeon y col., 1996), alterando la expresión genética de las IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12, aumentando la apoptosis de los linfocitos B, disminuyendo la expresión de TNF- α y su receptor y alterando las rutas de señalización intracelulares (Elfaki y col., 2012; Frie y col., 2015). Estos animales sufren un desorden inmunológico con cambios en el tipo de respuesta de linfocitos TCD4+ (Th), modificando el perfil de citoquinas presentes en ellos (Kabeya y col., 2001). Se cree que IL2 juega un rol en la progresión de la enfermedad provocando la proliferación de linfocitos B, lo que contribuye a la linfocitosis persistente inducida por el virus. Los animales serológicamente positivos también expresaban más IL12, clave para la inducción de una respuesta tipo Th1 (Yakobson y col., 1998). Por otro lado, el aumento en la expresión de citoquinas Th2 como IL10, se detectó en macrófagos de animales con Linfocitosis Persistente, viéndose afectada la respuesta inmune innata en esta etapa de la enfermedad (Trueblood y col., 1998).

Se ha demostrado que el vDVB induce una profunda inmunosupresión la cual contribuye tanto la patogenicidad del virus mismo como a la aparición de infecciones secundarias (Tizard, 2000). Este virus ha sido implicado en la depresión de la función de linfocitos T, producción de anticuerpos y las funciones de mononucleares y neutrófilos, pudiendo también destruir linfocitos en linfonodos, bazo, timo y placas de

Peyer (Markham y Ramnaraire, 1985). El efecto inmunosupresor generalizado que provoca este virus es capaz de deprimir ciertas funciones de los neutrófilos tales como la degranulación y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, además de disminuir la funcionalidad de las células T y la producción de anticuerpos. La supresión generalizada de la actividad linfocítica tiene un rol indirecto en la potenciación de la infección por otros patógenos (Roth y col, 1981) y esta se debe a la alteración del microambiente de citoquinas y mediadores provocada por la infección de las células del estroma linfoide (macrófagos y células de soporte) junto al efecto directo del virus sobre los linfocitos (Lértora, 2003).

4.2. TUBERCULOSIS

4.2.1. Definición

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad inflamatoria crónica, infectocontagiosa, caracterizada por la formación de granulomas, causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*. Afecta a un amplio rango de mamíferos, incluyendo el humano (zoonosis), creando tanto problemas de salud pública como pérdidas económicas debido a factores como disminución de la producción de leche, decomisos durante la evaluación *post mortem* en la planta de faena y costos de campañas de control y erradicación (Carrisoza-Urbina y col., 2019).

4.2.2. Etiología

Mycobacterium bovis es un bacilo Gram positivo, ácido alcohol resistente (AAR), aerobio, inmóvil, no esporulado, acapsulado, intracelular facultativo y no produce toxinas. Está compuesto por una pared multiestratificada de lípidos, dentro de estos se incluyen los ácidos micólicos, característicos de las micobacterias que le confieren su condición de AAR (Lüchter, 2004). La gran cantidad de lípidos concentrados en la pared celular le brindan resistencia frente a determinados fármacos, desinfectantes y contra factores adversos en el medio ambiente tales como la desecación. Son bacterias que poseen gran resistencia al calor aunque las radiaciones ultravioletas y la pasteurización (exposición a 72°C durante 15 segundos) son capaces de inactivarlas (Biberstein y Hirsch, 1999).

4.2.3. Epidemiología

La TB se encuentra presente en todo el mundo, encontrándose las mayores prevalencias en buena parte del territorio africano, ciertas partes de Asia en América (O.I.E., 2020).

M. bovis es el organismo con mayor rango de huéspedes, ya que puede infectar a todos los vertebrados de sangre caliente (Gil, 2012). Existen numerosos caminos por los cuales la TB puede transmitirse al bovino de forma directa o indirecta a través de pasturas, aguas, fómites, sin embargo, el propio ganado bovino enfermo sigue siendo la principal fuente de infección. Si bien las vías de infección están influenciadas por factores como la edad de los animales, características del ambiente y prácticas de manejo del predio, la excreción por vías aéreas e inhalación del microorganismo es el camino más utilizado por la bacteria para ingresar a su hospedador. Esta vía de transmisión se ve facilitada por el comportamiento natural del bovino, especialmente en rodeos lecheros con altas densidades de stock, en *feed lots*, remates de feria y transporte colectivo (Crosi, 2017). En los terneros jóvenes lactantes se espera que la vía oral sea la de mayor presentación, debido a la ingestión de leche contaminada proveniente de madres infectadas (Canal, 2013). Otras vías de transmisión son: cutánea, congénita, venérea por tracto genital infectado e intra-mamaria por iatrogenia o malas prácticas en el momento del ordeño (Neill y col. 2001).

El período de incubación del agente es prolongado y en ganado puede ser de varios meses o permanecer latente por años y ser reactivado por estrés u otros factores (Von Gehlen, 2015).

En países desarrollados, con programas de erradicación implementados, han logrado eliminar la enfermedad o reducirla en forma significativa. Por el contrario, en la mayoría de los países en vías de desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica, afectando principalmente al ganado lechero (Habarugira y col, 2014).

4.2.4. Patogenia

La dosis infectiva del *M. bovis* depende de la vía de entrada del bacilo al organismo del animal, es así que para infectar un bovino por vía digestiva se necesita una dosis mucho mayor que para producir la infección por vía aerógena (Palmer y Waters, 2006). Primariamente, las bacterias se multiplican en el sitio de ingreso y se desencadena una respuesta inmunitaria del huésped. Los macrófagos fagocitan al agente y lo tratan

de destruir. Las micobacterias desarrollaron un mecanismo de evasión de lisis celular y pueden sobrevivir dentro de los macrófagos. Estos, con el agente fagocitado, llegan a los linfonodos de drenaje y se activan los linfocitos T. La activación continua de los linfocitos lleva a la formación de los granulomas tratando de aislar a los bacilos. El granuloma específico de la TB, el tubérculo, se encuentra en forma nodular bien delimitado y de tamaño variable. Al inicio de la infección es de un color gris amarillento, firme y no enucleable que posteriormente pasa a ser un tubérculo amarillo con necrosis caseosa central resultando de productos de los macrófagos (Von Gehlen, 2015). Debido a que la vía respiratoria es la principal vía de infección en la TB, se ha descrito que la mayor parte de las lesiones observadas en esta especie se localizan en la cavidad torácica. El hallazgo de lesiones en la cavidad abdominal (linfonodos mesentéricos principalmente) es poco frecuente en los países en los que la pasteurización de la leche y los programas de erradicación permiten la eliminación de los animales tuberculosos antes de la diseminación de la micobacteria en el hospedador (Whipple y col, 1996; Menzies y Neill, 2000; Pollock y Neill, 2002).

4.2.5. Respuesta inmune

Para hacer frente a estos microorganismos intracelulares el hospedador cuenta con la respuesta inmune innata, mediada sobre todo por fagocitos y células *Natural Killers*, y con la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata, generalmente, no puede erradicar estas infecciones por lo que se necesita la contribución de la inmunidad adaptativa, la cual está compuesta en este caso principalmente por los macrófagos activados y los linfocitos T, células responsables de brindar la principal respuesta protectora e impedir el crecimiento y diseminación del *M. bovis* (Abbas y col, 2012). La TB estimula el desarrollo de tanto la respuesta inmune celular, mediada por células, como la respuesta inmune humoral, mediada por anticuerpos. La primera está involucrada en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que la respuesta mediada por anticuerpos se detecta en etapas tardías. (Neill y col., 2001). La inmunidad celular es el tipo de defensa mediada por linfocitos T, de los que existen dos tipos: los linfocitos T CD4+, que reclutan fagocitos y los activan a través de citoquinas como el IFN- γ para inducir la muerte de los patógenos; y los linfocitos T CD8+ citotóxicos, quienes provocan la lisis de las células infectadas. Ambos tipos de linfocitos son de importancia para la protección frente a bacterias intracelulares (Crosi, 2017). Por esta razón, aquellas personas o animales con una inmunidad celular

deficiente, como sucede en personas con inmunodeficiencia adquirida (VIH), son sumamente susceptibles a las infecciones por bacterias intracelulares como las micobacterias (Müller, 2013). Las pruebas oficiales de diagnóstico contempladas en el programa de erradicación de TB (intradermo-tuberculinización y detección de interferón-gamma) tienen como fundamento la inmunidad de tipo celular (Irureta, 2016).

4.2.6. Signos clínicos

La tuberculosis en bovinos generalmente se presenta como una enfermedad de evolución lenta, crónica y debilitante, aunque es posible una manifestación aguda y rápidamente progresiva. El período de incubación de este patógeno en condiciones naturales suele ser de meses o hasta años ya que esta bacteria puede permanecer en estado latente y reactivarse en ciertas situaciones como el estrés o la edad avanzada, por lo que un animal infectado puede transmitir el patógeno en el rodeo durante un período de tiempo prolongado sin manifestarse en forma clínica (OIE, 2020).

Gracias al uso de pruebas diagnósticas como la prueba ano caudal (PAC) intradérmica de derivado purificado proteico (PPD) utilizadas como *screening* o monitoreo en programas de erradicación de la enfermedad y a que las infecciones tempranas suelen ser asintomáticas, una gran parte de los animales infectados son detectados en forma temprana sin una sintomatología evidente (CFSPH-IICAB, 2009). Por otra parte, debido a la sintomatología inespecífica que presenta la enfermedad, la cual se manifiesta con emaciación progresiva, debilidad e inapetencia; disnea, respiración profunda y tos cuando la infección involucra el aparato respiratorio; y diarrea intermitente cuando la enfermedad afecta el tracto digestivo (Radostits y col., 2002), existen dificultades para realizar un diagnóstico clínico preciso (Lüchter, 2004). En algunos casos existe agrandamiento de ganglios linfáticos, los que pueden romperse y drenar, u obstruir vasos sanguíneos, vías respiratorias o tracto digestivo dependiendo de su localización (CFSPH-IICAB, 2009). Se estima que aproximadamente el 5% de las vacas tuberculosas, especialmente en casos avanzados, tienen lesiones en útero o metritis tuberculosas, y que entre el 1% y el 2% tienen una mastitis tuberculosa (Irureta, 2016), y que hasta el 44% de las vacas con lesiones compatibles con TB en cavidad torácica presentan lesiones en glándula

mamaria mencionando la posibilidad de que la misma, sea uno de los órganos más comúnmente afectado luego del pulmón (Garro, 2018).

4.2.7. Diagnóstico

El diagnóstico actual de la tuberculosis se basa fundamentalmente en la detección indirecta, mediante el empleo de pruebas que determinan la respuesta inmune desencadenada tras la infección y la detección directa del agente etiológico (Casal, 2016).

La O.I.E establece como prueba oficial la intradermotuberculinización para poder llevar a cabo comercialización de ganado a nivel internacional (OIE, 2020). Esta prueba caracteriza por ser una prueba de hipersensibilidad donde se mide la inflamación dérmica, causada principalmente por la respuesta inmune celular, 72 horas después de la inyección intradérmica del PPD (purificado derivado de proteína), en la piel del pliegue anocaudal o en la piel de la tabla del cuello (Schiller y col., 2010). El diagnóstico por PAC es realizado por un Veterinario de Libre Ejercicio, y es la única prueba oficial aprobada dentro de nuestro país. Para finalmente diagnosticar la enfermedad, se identifica al animal y se notifica al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), quien, mediante los Veterinarios Oficiales de División de Sanidad Animal, procede a realizar la prueba de tuberculina comparativa para confirmar y marcar a los animales positivos con una T en la quijada, quienes serán aislados y enviados directo a faena.

Para realizar la prueba cervical comparativa, el Veterinario Oficial utiliza dos tipos de PPD, uno derivado de la *Mycobacterium bovis* y otro derivado del *Mycobacterium avium*, los cuales se aplican intradérmicamente en el tercio medio de la tabla del cuello del bovino, con una distancia de 12 centímetros entre los puntos de inoculación. A las 72 horas, se mide utilizando un calibre y se compara la reacción entre ambas (Irureta, 2016).

Respecto a la sensibilidad de la intradermotuberculinización realizada en el pliegue anocaudal en ganado bovino se han descrito valores que oscilan entre 68 y 96,8% y de especificidad entre 96 y 98,8%, mientras que, para la intradermotuberculinización cervical comparada la sensibilidad descrita incluye un rango muy amplio, entre 52 y 100%, y de especificidad de 99.5 % (Casal, 2016). En base a revisiones publicadas en los últimos años, para el caso particular del test de tuberculina cervical simple, se han descrito valores de sensibilidad que varían entre 65 y 100%, mientras que la

especificidad se ha registrado entre 75 y 99% (Monaghan y col, 1994; De la Rúa-Domenech y col, 2006; Vordermeier y col, 2008).

Otra prueba diagnóstica *ante mortem* y clasificada como indirecta e *in vitro* es el test de Interferón-Gamma. Se basa en la evaluación de la respuesta de inmunidad celular de los animales. Mide la concentración de IFN- γ , producido principalmente por linfocitos T, en cultivos de sangre entera (*in vitro*), luego de una estimulación con PPD bovino y PPD aviar (Crosi, 2017).

Además de las pruebas a campo, el diagnóstico también se realiza en planta de faena, al momento del sacrificio, mediante una inspección de las canales; siendo una actividad básica en la vigilancia epidemiológica de la TB. Se realizan faenas especiales donde solo se sacrifican animales positivos a las pruebas de intradermotuberculinización; realizándose en un número menor a la capacidad de faena normal de las plantas para poder realizar una inspección rigurosa y disminuir el riesgo de infección en los operarios, quienes cuentan con todos los medios de protección necesarios (Casas Olascoaga, 2013). A partir de las muestras tomadas en la planta de faena, se aplican técnicas diagnósticas que se basan en la detección del agente (Casal, 2016):

- Coloración de Ziehl-Nielsen: identifica la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes, no formadores de esporas inmóviles y acapsulados, características del género *Mycobacterium*. Los bacilos se observan de color rojo brillante. Las principales limitaciones de este método diagnóstico es que requiere de una elevada carga bacteriana y que es poco específico (Irureta, 2016).
- Histopatología: consiste en la observación anatomopatológica del granuloma tuberculoso, localizado normalmente en el pulmón y/o en los linfonodos bronquiales y mediastínicos. Los granulomas son formaciones de carácter inflamatorio productivo, por lo común de 1 a 2 mm de diámetro, formados por células de carácter inflamatorio como macrófagos, células gigantes de Langhans y linfocitos (Casal, 2016).
- Microbiología: el cultivo microbiológico es la técnica diagnóstica de referencia (*gold standard*) para confirmar la existencia de la enfermedad (OIE, 2019). La principal limitación que presenta esta técnica es que la probabilidad de obtener un cultivo positivo de un animal infectado es mayor si se parte de muestras con lesiones compatibles, llegando hasta el 85%, pero su sensibilidad es muy limitada en las fases tempranas de la infección, siendo difícil confirmar la enfermedad. El cultivo dura de 3

a 6 semanas en desarrollarse, las colonias son pequeñas, secas y con aspecto escamoso (Irureta, 2016).

Las técnicas de respuesta inmune humoral, como la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), son técnicas *in vitro* que cuantifican los anticuerpos específicos del animal en sangre. Se puede utilizar la prueba de ELISA indirecto en la leche del tanque, la cual posee baja sensibilidad pero es fiable en la detección de vacas "anérgicas" a las pruebas de la tuberculina e Interferón-Gamma (Fischer y col., 2005).

Por último, una importante alternativa es la identificación del genoma bacteriano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias génicas. Su eficacia radica en la rápida identificación de patógenos de difícil cultivo. En ese contexto, el desarrollo de un procedimiento que identifica directamente a *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido y secreción proveniente de animales tuberculosos debe ser el objetivo de todos los países (Irureta, 2016).

4.2.8. Legislación Nacional

En 1882 Robert Koch descubrió el bacilo causante de la tuberculosis y en 1890 presentó sus estudios sobre la tuberculina. En el Uruguay, el 14 de octubre de 1896 la Municipalidad de Montevideo dictó la ordenanza que impuso la intervención del Laboratorio Municipal de Bacteriología y Micrografía como requisito previo a la entrada de animales lecheros a tambos de Montevideo, y la observación clínica y tuberculinización en el Corralón Municipal. En 1902 el Ministerio de Gobierno aprobó una ordenanza y reglamento referente al servicio de tuberculinización e inspección veterinaria, estableciendo que ningún animal destinado a la explotación lechera sería admitido en tambos y lecherías de Montevideo sin contar con autorización otorgada previo examen veterinario y tuberculinización satisfactoria. Los propietarios de los animales decomisados recibían compensación (Casas Olascoaga, 2013).

La ley Nro. 3.606 de Policía Sanitaria de los Animales, promulgada el 13 de abril de 1910, en su artículo 35 incluyó la tuberculosis entre los vicios redhibitorios. El decreto del 5 de diciembre de 1916 extendió la tuberculinización subcutánea a los animales de lechería de todo el país en igual forma y bajo la misma reglamentación que en el departamento de Montevideo.

El reglamento de tambos y lecherías de 25/11/1911 contiene normas claras sobre tuberculinización de ganado lechero y previendo la inspección por los servicios

veterinarios oficiales además de instalar el principio de calidad de la leche (Casaux, 2005). Desde 1916 es obligatoria la tuberculinización en todo el territorio nacional (Casas Olascoaga, 2013).

Por decreto, en 1963 se implementó el Plan de Leche Calificada, según el cual la leche-cuota con destino al abastecimiento recibió precios diferenciales. La Cooperativa Nacional de Productores de Leche (CO.NA.PRO.LE) bonificaron con un precio estímulo a leche de predios adheridos voluntariamente, si cumplían con los requisitos higiénico – sanitarios para el ambiente, los operarios y los animales; llegando este programa a todo el país en el año 1976 (Von Ghelen, 2015).

Según el decreto 79/84 del 22 de febrero de 1984, debe comunicarse de forma inmediata el servicio veterinario departamental de la División Sanidad Animal (DSA) del MGAP si se detectaron animales con resultado positivo a la prueba presuntiva de TB. El veterinario oficial debe realizar la prueba intradermotuberculinización cervical comparativa (prueba confirmatoria) a los animales anteriormente detectados positivos a TB.

Por decreto 90/95 de 21/2/1995 se instala el Sistema Nacional de Calidad de Leche, quien determina las exigencias mínimas y obligatorias para la posterior pasteurización e industrialización de la leche (Casaux, 2005).

En 1998 se regularizaron por ley los requisitos sanitarios para los establecimientos productores de leche, la declaración de predios oficialmente libres de Brucelosis y Tuberculosis y la vigilancia epidemiológica (Decreto 20/998 de 22/1/1998). Por ese decreto se previó que es obligatoria la sanidad del ganado completo para obtener la habilitación o refrendación de toda empresa que produzca leche con destino comercial. Referido a TB, se estableció que la prueba de intradermotuberculinización con PPD bovina se debe realizar en un intervalo mínimo de 6 meses y máximo de 12 meses (Casaux, 2005) como lo sugiere el código sanitario de la OIE. Con la trazabilidad grupal de DICOSE y las herramientas del SNIG, al detectar un foco se reconstruyen los movimientos de ganado para detectar predios epidemiológicamente relacionados y tomar medidas anticipadas en ellos, disminuyendo y eventualmente evitando así la diseminación de la enfermedad (Von Ghelen, 2015).

4.2.9. Tuberculosis bovina como zoonosis

La tuberculosis es causa de enfermedad en millones de personas, y junto con el virus de inmunodeficiencia en humanos (VIH) son de las principales causas infecciosas de

muerte en el mundo. El VIH es la principal causa de que no se logre alcanzar las metas de control de la tuberculosis en zonas donde la combinación de ambas infecciones es frecuente. La tuberculosis a su vez es la causa más importante de mortalidad entre las personas que viven con VIH/SIDA (OMS, 2019). A nivel mundial se estima que 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis en 2018, registrándose 1,2 millones de muertes por tuberculosis entre personas VIH-negativas y otras 251.000 muertes en personas VIH-positivas (Informe Mundial Sobre Tuberculosis, 2019).

Actualmente a nivel mundial, en países donde la tuberculosis bovina está bien controlada o fue eliminada en algunas áreas, los casos de infecciones en humanos por *Mycobacterium bovis* son pocos. Un análisis realizado en Europa reveló una proporción de 0,4% de infección por *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium caprae* sobre el total de casos de tuberculosis humana reportados (Müller, 2013).

En Uruguay hasta el año 2011 no se habían reportado casos confirmados de tuberculosis en humanos causadas por *Mycobacterium bovis*, incidiendo en este aspecto las medidas de control a nivel veterinario sumadas a la pasteurización de la leche y controles sanitarios de sus productos derivados. En el 2011 se detectaron en el país los primeros tres casos de tuberculosis humana con *Mycobacterium bovis* como agente etiológico causal, confirmándose en el Instituto Pasteur de Montevideo a través de la tipificación fenotípica y secuenciación genómica. Luego del estudio epidemiológico efectuado sobre dichos casos, se constató que uno de ellos contaba con historia de contacto con animales en un zoológico, otro fue un paciente VIH positivo que había trabajado en íntimo contacto con bovinos, mientras que el tercero ingería habitualmente leche cruda (Crosi, 2017).

En conclusión, si bien el *Mycobacterium bovis* es responsable de una baja proporción de tuberculosis humana, es necesario seguir desarrollando e implementando medidas para el control, eliminación y posible erradicación de esta infección en humanos. En este sentido, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) incluye a la tuberculosis dentro del grupo de riesgo/peligro III, para la cual se deben de tomar las precauciones necesarias para la prevención de una infección en el ser humano (OIE, 2019).

4.3. LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

4.3.1. Definición

El virus de la Leucosis bovina enzoótica (BLV) es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo, presentando en Uruguay una prevalencia serológica en rodeos lecheros muy alta, encontrándose incluso en animales jóvenes prevalencias de cerca del 50% (De Brun y col., 2014). El 90% de los animales infectados son asintomáticos (aleucémicos o con linfocitosis persistente), llevando a pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones importantes en el sistema inmune (Bartlett y col., 2013; Bartlett y col., 2014; Frie y col., 2015).

4.3.2. Etiología

Se trata de un virus ARN exógeno perteneciente a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y al género *Deltaretrovirus* (ICTV, 2019). Este virus afecta células de la línea linfóide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie, aunque también persiste en otras células como los monocitos y macrófagos.

El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARN de polaridad positiva unidos por su extremo 5' e integrado por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, los cuales son necesarios para su síntesis (OIE, 2018a). El gen *gag* se encarga de codificar, entre otros, la producción de la proteína p24 de la cápside quien es el blanco de los anticuerpos generados por el hospedador, mientras que el gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura (gp51 de superficie y gp30 transmembrana) (Gillet y col., 2007). La mayoría de las pruebas serológicas rutinarias detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51 (OIE, 2018a).

Es un virus muy poco resistente a las influencias exteriores, por lo que tiene una viabilidad de menos de cuatro horas fuera del animal. Los rayos ultravioletas, la congelación-descongelación repetida y la pasteurización inactivan el virus, al igual que los desinfectantes comúnmente utilizados (Orloff y col., 1993).

4.3.3. Epidemiología

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) tiene una gran importancia a nivel mundial debido a su amplia distribución e incidencia, especialmente en los sistemas de producción lechera (Lüchter, 2004). Las prácticas de manejo que difieren sustancialmente entre ganado lechero y el de carne son factores significantes para la transmisión del virus. Esta patología se encuentra relacionada directamente a los sistemas de manejo intensivo, con un estrecho contacto físico entre los animales y una importante mano del hombre (Dimmock y col., 1991).

La tasa de infección se incrementa a medida que aumenta la edad y también ha sido demostrada una mayor susceptibilidad en animales con alto potencial lechero (Detilleux y col., 1991; Jacobs y col., 1995).

4.3.4. Situación en Uruguay

Nuestro país se posiciona como un gran exportador de lácteos, caracterizándose el sector lechero por una gran intensificación en los últimos años la cual se ve reflejada en el aumento de la producción anual de leche (1620 millones de litros en 2005 vs 2173 millones litros en 2018), la disminución de establecimientos remitentes (3312 vs 2622 en el mismo período) y la disminución de la superficie dedicada a la lechería (852.000 has vs 754.000 has respectivamente) (DIEA - MGAP, 2019).

Históricamente nuestro país ha exportado vaquillonas Holando en pie hacia diversos destinos, siendo esta enfermedad una de las principales barreras sanitarias; por lo que desde el punto de vista económico la principal importancia de la BLV recae en las restricciones de los mercados internacionales para la compra de animales en pie (MERCOSUR, 1996; Riet y col., 2019).

Las primeras evidencias de la enfermedad en nuestro país fueron presentadas en la década del 60 por Quiñones y Casas. En el año 1996 se muestrearon 30 predios y se analizaron 400 animales por la técnica de ELISA en el Noreste del país, resultando en una prevalencia de BLV del 20% y presentando el 77% de los predios algún animal seropositivo (Mederos e Irigoyen, 1998). En 1998 se realizó un monitoreo en lechería dentro del departamento de Florida para varias enfermedades infecciosas, donde se visitaron 53 establecimientos y se recolectaron muestras de sangre de 1060 animales seleccionados al azar. Se proyectó una seroprevalencia de 46,62% para BLV mediante la técnica serológica ELISA (Guarino, 2001). Se realizó otro estudio durante

1997-2000 en 4 establecimientos dentro del departamento de Salto. Fueron estudiados 534 animales de raza Holando y pertenecientes a distintas categorías. El estudio demostró que 238 animales (45%) fueron positivos a LBE mediante la técnica de ELISA y que el 24% de las muestras a las que se realizó PCR fueron positivas (Collazo y col, 2002).

En el año 2003 se determinó la seroprevalencia de LBE, mediante la técnica de ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de Florida, San José y Colonia, dando como resultados seroprevalencias de 75% en Florida, más de 80% en San José y 57% en Colonia (Zaffaroni y col, 2007). En el 2009 se estudiaron 689 vacas en producción de 41 establecimientos dentro de los departamentos de Durazno, Florida y Tacuarembó. Se utilizó como prueba diagnóstica la Inmunodifusión en gel de agar, resultando en un 10,4% de animales positivos (Furtado y col., 2013).

En el año 2014 se realizó un estudio sobre 397 animales en un campo de cría de nuestro país, encontrándose al ingreso de dicho sistemas prevalencias cercanas al 50% en animales jóvenes menores de 1 año (De Brun y col., 2014). En 2015, en el marco de un muestreo serológico aleatorio para determinar la prevalencia de distintas enfermedades que afectan los bovinos, la seroprevalencia para leucosis 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 y col., 2019).

El número de animales positivos en nuestro país ha ido en aumento en las últimas décadas, llevando a que esta enfermedad sea una de las más prevalentes en el ganado bovino lechero (Guarino, 2001; Riet y col., 2019).

4.3.5. Transmisión

La transmisión del BLV puede ser tanto vertical como horizontal, siendo esta última la principal vía de contagio (Hopkins y DiGiacomo, 1997). Las medidas de manejo que facilitan la transmisión horizontal de este patógeno incluyen tanto el contacto entre categorías como cualquier práctica veterinaria (extracción de sangre, vacunación, descorne, tatuajes, castración, aplicación de inyectables, palpación rectal entre otros) que se practique sin tomar medidas profilácticas correspondientes, conformando una importante forma de diseminación de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerick y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Los artrópodos hematófagos, también cumplen un rol en diseminación de esta enfermedad al ingerir sangre con células infectadas e inocularlas en otro animal susceptible (McCluskey, 2002), aunque resulta difícil estimar su alcance en condiciones prácticas (Perino y col., 1990; Johnson y Kaneene, 1992; Wentink y col., 1993).

El contacto prolongado entre animales sanos y enfermos, es considerado un factor de alto riesgo para que los animales sanos contraigan la enfermedad (Rodríguez y col, 2011). Se encuentra una tendencia a que las vacas de alta producción y calidad de leche sean seropositivas a BLV, lo que se cree debido a la tendencia de estos animales a permanecer más tiempo en el establecimiento, aumentando así las posibilidades de infección (Jacobs y col., 1995).

La transmisión natural del patógeno es más lenta en aquellos rodeos con una baja o moderada prevalencia de la infección, mientras que en establecimientos con alta prevalencia este difunde mucho más rápidamente (Dimmock y col., 1991). La edad en que los animales se contagian está influida por la situación epidemiológica dentro del rodeo, ya que en aquellos con elevadas prevalencias se favorece la aparición de la infección en animales más jóvenes (DiGiacomo, 1992).

La transmisión vertical ocurre en un 15% de los casos y se da cuando una vaca infectada transmite el virus a su progenie vía transplacentaria o digestiva por medio del calostro y leche (Ferrer y Piper, 1981; Martin y col, 2001). La susceptibilidad de los terneros a la infección por calostro estaría modificada por la presencia de anticuerpos calostrales contra BLV. Distintos estudios han demostrado que una estrategia de control importante para reducir la transmisión de la infección a temprana edad sería mediante la ingesta de calostro proveniente de una madre positiva, es decir con anticuerpos anti BLV (Van der Maaten y col, 1981; Lassauzet y col, 1989; Nagy y col, 2007) seguida de una alimentación con leche de vacas negativas a BLV o con suplemento lácteo (Gutierrez, 2010).

4.3.6. Signos clínicos

En esta enfermedad pueden distinguirse tres fases luego del contagio con el BLV (Fenner y col., 1992): A- Una fase inaparente que se ve en un elevado porcentaje de los animales del establecimiento, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y la producción de anticuerpos específicos contra

antígenos virales, principalmente la glicoproteína gp51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989), esta fase es conocida como aleucemica. B- Linfocitosis persistente, la cual se define como un aumento en el recuento de linfocitos superior a 3 desvíos estándar sobre la media en 2 muestras analizadas separadas en el tiempo por un periodo de 60 a 90 días (Bendixen, 1963; Marshak, 1968) y en la que los animales aparentan estar sanos desde un punto de vista clínico (Beier, 2008). C- Enfermedad tumoral (linfosarcomas) que suele manifestarse entre los 5 y los 8 años de edad en un bajo porcentaje de la población (5–10 %) y que lleva irremediamente a la muerte del animal (Chamizo, 2005).

La sintomatología causada por el linfosarcoma tiene un comienzo muy insidioso y depende del lugar donde aparecen los tumores (OIE, 2019a). Se puede observar disnea, adelgazamiento, disminución del apetito, fatiga, disminución del rendimiento lácteo y anemia (De la Sota, 2004).

Existen controversias en relación a la influencia de la infección por el BLV sobre los parámetros reproductivos, no estando suficientemente claro si la infección subclínica por este patógeno afecta la performance reproductiva del ganado bovino. Algunas investigaciones establecen que las diferencias en los parámetros reproductivos entre seropositivos y seronegativos no son significativas (Huber y col., 1981; Kale y col., 2007; Betancur y Rodas, 2008); sin embargo, otros ensayos realizados en sistemas de producción de leche encontraron que vacas infectadas con BLV requerían más servicios por concepción (García y col., 2000), que la tasa de concepción de animales seropositivos fue un 7% menor que la de los animales negativos (VanLeeuwen y col., 2010) y un 26% menos de preñez en los animales positivos a BLV en comparación con los seronegativos durante un período reproductivo de vaquillonas (Puentes y col., 2016a). Por otro lado se analizó el efecto del BLV sobre los principales parámetros reproductivos y productivos en establecimientos lecheros (Intervalo Parto/Servicio, Servicios/Concepción, Intervalo Interparto, Producción y Composición de la Leche y Tasa de Refugos), evidenciándose únicamente un aumento significativo en el intervalo interparto en los animales seropositivos con respecto a los seronegativos (Sienra y col., 2000). Finalmente, un estudio observó que el efecto de la infección sobre la fertilidad es mínimo, sin embargo la producción de leche era más baja en animales infectados que en los no infectados (Emanuelson, 1992).

4.3.7. Respuesta inmune

Uno de los primeros indicadores de infección por el BLV es el comienzo de la respuesta humoral antiviral (entre una y ocho semanas post inoculación), sintetizándose anticuerpos que reconocen los epítopes estructurales (gp51 y p24) y proteínas regulatorias del virus (Florins y col., 2007).

El virus causa disturbios en el sistema tanto a nivel de la respuesta inmune innata como adaptativa. Se ha visto que los animales seropositivos en fases tempranas de la infección desarrollan una respuesta celular con predominio de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), con producción de interferón gamma, y consecuentemente síntesis sobre todo de IgG2, mientras que en fases más crónicas con presencia de linfocitosis persistente se produce una respuesta con un perfil Th2, generándose un cambio importante en las citoquinas producidas por el animal (Pyeon y col., 1996, Yakobson y col., 1998). Se cree que IL2 (citoquina Th1) juega un rol en la progresión de la enfermedad, provocando la proliferación de linfocitos B, contribuyendo a la linfocitosis persistente inducida por el virus (Trueblood y col., 1998).

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. Luego de la infección, la actividad humoral y citotóxica detiene eficientemente el ciclo replicativo del virus, pero permite la expansión mitótica de aquellas células que contienen el provirus (Florins y col., 2007).

Adicionalmente, las células T infectadas con el BLV aumentan la expresión de receptores inmunoinhibitorios, lo que produce un incremento en la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador. La expresión de los receptores inmunoinhibitorios esta correlacionado positivamente con la carga proviral del BLV (Bartlett y col., 2014).

La alteración del sistema inmune provocado por esta infección puede aumentar la incidencia de otras patologías, generando un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico (Trainin y Brenner, 2005). Se encontró mediante el uso de *odd ratio* una marcada tendencia en enfermedades con posible etiología infecciosa tales como mastitis, gastritis, neumonía y problemas podales, a mostrar una

asociación consistente con la infección por BLV, mientras que enfermedades no infecciosas no demostraron esta asociación (Emanuelson y col., 1992).

Se han realizado varios trabajos evaluando la respuesta a la vacunación contra diferentes patógenos en animales infectados por BLV, describiéndose una disminución en ella con respecto a la encontrada en animales negativos al virus. Se ha publicado que los títulos obtenidos de IgM e IgG2 en estos animales post vacunación con bacterina J5 contra *E. coli* incrementaron modestamente en relación a los animales control no vacunados, mientras que en los animales que no están infectados estos títulos incrementan considerablemente (Erskine y col., 2011). También se encontró en nuestro país que la respuesta de IgG1 contra el virus de la fiebre aftosa es de menor magnitud en animales BLV+ que en aquellos BLV- luego de la vacunación con una vacuna comercial aprobada por el MGAP contra este virus (Puentes y col., 2016b). Otros estudios internacionales demostraron que animales BLV+ producen un menor título de anticuerpos en respuesta a la vacunación con la vacuna polivalente comercial que contiene HVB-1, DVB tipo 1 y 2, PI3, VSRB y *Leptospira*), con una reactividad anormal a la estimulación antígeno específica y mitogénica tanto de los linfocitos B como T, demostrando consistentemente menos IgM, similar IgG1 y potencialmente menos IgG2 secretada (Frie y col., 2016).

4.3.8. Diagnóstico

En estados avanzados de la enfermedad, con presencia de tumores, el diagnóstico se puede realizar mediante examen clínico, biopsia y/o necropsia; pero en animales asintomáticos (aleucémicos o que presentan linfocitosis persistente) se requieren pruebas de laboratorio para poder realizarlo.

Diferentes técnicas han sido utilizadas para el diagnóstico de laboratorio, incluyendo métodos directos para identificar el agente (mediante la detección de proteínas codificadas por el virus o de las propias partículas virales) y métodos indirectos destinados a verificar la presencia de anticuerpos específicos.

Debido al hecho de que hasta el momento no existen vacunas para esta enfermedad, el diagnóstico serológico sigue siendo una práctica de rutina en muchos países. Las técnicas de referencia empleadas son la Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA) y el ELISA. En el caso de la detección molecular (métodos directos) se pueden utilizar

técnicas como la nested-PCR y la *Real Time* PCR (Felmer y col. 2006; Rama y col., 2010; OIE, 2019a).

En los estudios de rutina se aplican métodos indirectos, como la IDGA y el ELISA (Everman y col., 1997; Radostits y col., 2002). El uso del ELISA, debido a su rapidez, lectura objetiva, elevada sensibilidad y especificidad y a que puede ser utilizado tanto en muestras individuales como colectivas, ha significado un importante avance en el diagnóstico de la LBE. Su elevada sensibilidad permite también su aplicación en leche, evitando la extracción de sangre y facilitando el proceso de obtención de muestras en grandes poblaciones (Rhodes y col., 2003; Sienra y Guarino, 1991). Son técnicas aceptadas por nuestro país como pruebas oficiales para el diagnóstico del BLV.

El diagnóstico molecular es muy útil en animales con bajos títulos de anticuerpos o en infecciones recientes donde aún no se pueden detectar niveles de anticuerpos en suero. La nested-PCR es una técnica muy utilizada, detectando secuencias del gen *env*, codificante de la glicoproteína gp51 del BLV (Ballagi-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006). El principal punto negativo de esta técnica es la necesidad de infraestructura adecuada y técnicos altamente capacitados. Esta prueba diagnóstica puede ser utilizada de forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas (Beier, 2008).

Más recientemente se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) muy útiles para la cuantificación de carga viral en animales infectados, siendo útil cuando queremos determinar la asociación cuantitativa de BLV en animales infectados y la repercusión de este sobre variables de interés productivo, reproductivo y/o sanitario (OIE, 2012; Rola-Luszczak, 2013).

4.4. DIARREA VIRAL BOVINA

4.4.1. Definición

La DVB es una enfermedad viral de distribución mundial, de muy alta prevalencia en Uruguay (Saizar y Gil, 1998; Guarino y col., 2008), siendo la causa de una de las infecciones más importantes del ganado bovino debido a su alta prevalencia y a las grandes pérdidas económicas que genera, relacionadas a un aumento de la morbilidad y mortalidad debido a la inmunosupresión, reducción de la concepción al primer servicio, muertes embrionarias tempranas, deformidades congénitas, aumento

de intervalo inter parto y reducción en la producción de leche (Houe, 1999; Richter, 2017). Es reconocida como una de las causas más importantes de trastornos reproductivos en el ganado bovino, siendo este el mayor impacto económico causado por la infección (Lértora, 2003).

4.4.2. Etiología

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) pertenece a la familia *Flaviviridae* (al igual que el virus de la Peste Porcina Clásica y la Enfermedad de Border en los ovinos) y al género *Pestivirus* (ICTV, 2019b).

Es un virus esférico y envuelto, compuesto de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella (Nettleton y Entrican, 1995).

La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica. El vDVB se basa en esta estrategia para persistir, originando cepas que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador (Paton, 1995).

Según su comportamiento *in vitro* (efecto en cultivos celulares), el vDVB se divide en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los biotipos CP ocasionan vacuolización citoplasmática y muerte celular, mientras que los biotipos NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular, teniendo la célula infectada una apariencia normal. Esto no implica que los biotipos NCP no sean patogénicos, este biotipo es aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente, mientras que el biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad de las mucosas y se originan por mutación a partir del biotipo NCP (Deregt y Loewen, 1995).

A partir de la genotipificación, se han determinado dos genotipos dentro del vDVB, Genotipo I y Genotipo II (Ridpath, 1996), los cuales se distinguen por sus características genómicas y la sintomatología que producen. El Genotipo II está relacionado a cepas más virulentas que producen una enfermedad hemorrágica con marcada trombocitopenia y que, a diferencia del Genotipo I, ocasionan una alta mortalidad (Guarino y Nuñez, 2001; Lértora, 2003).

Este virus es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH menor a 5,7 y mayor a 9,3 (Houe, 1995).

4.4.3. Epidemiología

El vDVB ha sido detectado en la mayoría de los países en donde se encuentra el ganado bovino, con una tendencia a ser endémico en las poblaciones de estos animales (Houe, 1999).

Los Pestivirus infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden Artiodáctila (porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, entre otros), lo cual debe ser tenido en cuenta ya que ellos pueden cruzar la barrera de especie (Nettleton y Entrican, 1995). La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos persistentemente infectados (PI), quienes eliminan grandes cantidades del virus mediante las diferentes secreciones y excreciones corporales continuamente durante toda su vida. Los animales con infección aguda eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos períodos de tiempo, por lo que son una fuente de infección de menor importancia (Houe, 1995).

4.4.4. Situación en Uruguay

Aunque se sospechaba clínicamente de la presencia de esta patología en nuestro país desde algunas décadas antes, fue en el año 1996 que se comunicó su detección por técnicas inmunohistoquímicas e inmunoperoxidasa (Repiso y col, 2004).

Diversos estudios serológicos, tanto en ganado de carne como de leche, han estimado la prevalencia de la infección en nuestro país. En el año 1998, se estimó que el virus estaba presente en entre el 97 y el 100% de los establecimientos y en entre un 60 a 72% de la población bovina a nivel individual (Saizar y Gil, 1998). Por otro lado, en Uruguay, un estudio serológico realizado en bovinos de carne entre los años 2000 y 2001 indicó que el 69% de 6358 animales estudiados eran seropositivos (Guarino y col. 2008).

En el año 2016 se realizó la caracterización genética de vDVB en Uruguay con muestras de predios con problemas reproductivos colectadas en el 2014, mostrando que tanto el Genotipo I como el Genotipo II circulan en los rodeos dentro del territorio nacional, observándose una supremacía del Genotipo I con un 87,5% (Maya y col, 2019).

4.4.5. Transmisión

La transmisión del vDVB puede darse tanto de forma vertical como horizontal, por contacto directo o indirecto. La principal forma de introducir el virus a un rebaño

susceptible es a través de la adquisición de bovinos persistentemente infectados (PI) o de hembras que transportan fetos PI (Houe, 1999).

En la transmisión vertical, la infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles que fueron infectadas durante la preñez. Si se trata de una infección por biotipos NCP antes de que el feto adquiera competencia inmunológica, lo que sucede alrededor del día 125 de gestación, el animal desarrollará una infección persistente, de los cuales muchos alcanzarán la madurez sexual y se reproducirán pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%). Las hembras PI siempre producirán terneros PI (Houe, 1995 y 1999).

La transmisión vertical también puede ocurrir en la transferencia de embriones, si el recipiente o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Stringfellow y Givens, 2000).

Sobre la transmisión horizontal, el contacto directo con animales PI es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales, aunque el contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus (Houe, 1995 y 1999). El semen proveniente de toros PI o que estén cursando una infección aguda, tanto crudo como criopreservado, es una importante vía de transmisión horizontal, por lo que es esencial un examen del eyaculado antes que el semen sea distribuido (Fray y col., 2000).

Experimentalmente se han demostrado varias vías de transmisión indirecta (uso de agujas, mochetas, palpación rectal e insectos hematófagos entre otros), aunque su importancia práctica no está muy clara, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Otra forma importante de transmisión es el uso de vacunas a virus vivo modificado o vacunas contaminadas (Lértora, 2003).

La tasa de transmisión dentro del rebaño depende de cómo es introducido el virus. Cuando ocurre por la introducción de un animal PI, la transmisión del virus a los animales susceptibles ocurre rápidamente a la mayor parte del rebaño; mientras que cuando ocurre por la introducción de un bovino con infección aguda o por alguna otra vía que inicie una infección aguda, la transmisión es de corta duración y solo incluye un pequeño porcentaje del rebaño antes de que esta cese (Lértora, 2003). Hablando de los sistemas de producción, la diseminación es más eficiente en aquellos que permiten un estrecho contacto entre animales (Houe, 1995).

4.4.6. Signos clínicos

La infección por el vDVB se presenta de una forma multifacética con cuadros clínicos variados. Se han descrito cuatro síndromes principales: infección aguda, infección intrauterina, infección persistente y enfermedad de las mucosas (Ramírez y col. 2012). La presentación aguda de la DVB ocurre en infecciones post natales de bovinos seronegativos e inmunocompetentes (Kelling, 1996). La mayor parte de ellas son subclínicas o de moderada intensidad, presentando una morbilidad y una mortalidad bajas (Baker, 1987; Kelling, 1996). Dentro de las presentaciones agudas de la DVB se encuentran el complejo diarrea neonatal bovina, cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos (Moennig y Liess, 1995) y la infección aguda severa, cada vez más frecuente, que presenta elevada morbilidad y mortalidad y se asocia a virus de alta patogenicidad, caracterizándose por la presencia de fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita (Drake y col., 1996).

Existen datos de que la infección aguda puede causar una inmunodepresión en el animal, favoreciendo la aparición de otras enfermedades infecciosas, debido a que el vDVB actúa disminuyendo las funciones inmunes asociadas principalmente con respuestas inmunes de tipo celular (Potgieter, 1995). Este virus tiene tropismo por los linfocitos, tanto linfocitos T como B, produciendo la destrucción de los mismos en nódulos linfáticos, bazo, timo y placas de Peyer, y disminuyendo además la capacidad fagocítica y bactericida de los neutrófilos (Tizard, 2000). Es por eso que se ha descrito que la inmunosupresión causada por el vDVB tiene el potencial de exacerbar el impacto de otras coinfecciones y puede permitir el establecimiento o recidivas de infecciones, por lo que este patógeno ha sido asociado con un incremento en la severidad de infecciones respiratorias, entéricas y reproductivas (Byrne, 2017).

La infección intrauterina es causada por una infección aguda en una hembra gestante y, dependiendo de la etapa de la gestación que afecte, produce diferente sintomatología (Saizar y Gil, 1998).

Según sus manifestaciones clínicas en intervalos de tiempo específicos, la infección intrauterina se divide en cuatro períodos. Si esta se da en la etapa embrionaria de la gestación, entre los días 0 a 45 de la misma, ocasionará muerte embrionaria y repeticiones de servicio, hasta que la hembra desarrolle una respuesta inmune. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8 o 9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles (Vanroose y

col., 2000). Como ya se mencionó, cuando la infección ocurre entre los días 45 y 125 de gestación, período que comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al virus, la infección con biotipos NCP resulta en el nacimiento de animales PI e inmunotolerantes, quienes son virémicos durante toda su vida y se encuentran propensos a desarrollar la enfermedad de las mucosas al sufrir una sobreinfección con biotipos CP (Kelling, 1996). En este período también se puede producir muerte fetal con momificación o aborto meses después y un porcentaje menor de teratogénesis (Dubovi, 1994).

Si la infección ocurre entre los días 125 y 175 de gestación, lo que representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, produce un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo, pudiendo observarse diferentes tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelosa, hidrocefalia, microcefalia, artrogriposis y deformidades esqueléticas entre otros. También puede producir abortos, pero estos son menos frecuentes que cuando la infección ocurre en etapas tempranas de la gestación (Dubovi, 1994).

Finalmente, si la infección ocurre desde el día 175 de gestación en adelante, etapa en la que el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente, puede resultar en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles, siendo ocasionales los abortos (Dubovi, 1994, Lértora, 2003).

Los animales PI son los principales encargados del mantenimiento y diseminación del virus en los rodeos (Houe, 1999). Ellos son virémicos durante toda su vida e inmunotolerantes, por lo que no producen anticuerpos contra el virus. Debe considerarse esta condición en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadros recurrentes de enfermedades respiratorias y digestivas; mientras que algunos animales PI son clínicamente normales, por lo que las pruebas de laboratorio son fundamentales para su diagnóstico (Kelling, 1996).

La enfermedad de las mucosas ocurre únicamente en animales PI que sufren una sobreinfección con biotipos CP homólogos, por lo que en ellos se aíslan ambos biotipos. Esta forma de la enfermedad es esporádica y fatal, pudiendo presentar un curso agudo o crónico y es caracterizada por la presencia de una severa leucopenia, diarrea profusa, y de erosiones y ulceraciones en el tracto digestivo (Baker, 1987; Kelling, 1996).

4.4.7. Respuesta inmune

El vDVB estimula la producción por parte de los linfocitos Th de altos niveles de IL-4, pero no de IL-2 e IFN γ , favoreciendo una respuesta tipo Th2, con la que los linfocitos Th intervendrían ayudando a la producción de anticuerpos neutralizantes para limitar la diseminación del virus. En muchos procesos virales, el predominio de la respuesta Th2 se ha relacionado con un estado de inmunosupresión, como es el caso de la DVB, donde la respuesta de tipo Th2 que se produce podría interferir con el desarrollo de una respuesta tipo Th1 protectora frente a otros agentes patógenos (Rhodes y col., 1999).

En respuesta a la infección con cepas CP en el transcurso de infecciones agudas, se produce una rápida y potente respuesta temprana local con la liberación de Interferón de tipo I (α/β) por parte de los monocitos/macrófagos o las células dendríticas, responsable de activar las células efectoras de la respuesta inmune innata como los eosinófilos, los macrófagos y las células NK, limitando de esta forma 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 los linfocitos T, los cuales migrarán hacia el tejido dañado para eliminar al virus y a las células afectadas. 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 (Palucka y Banchereau, 2002; Glew y col. 2003).

La infección por cepas NCP 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 lo tanto, la replicación del virus no estará limitada y éste se diseminará en gran medida por todo el organismo. A pesar de ello, el virus es llevado 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 viral. Se genera así una respuesta inmune primaria efectiva (Charleston y col, 2002; Glew y col., 2003), que sin embargo, no evita la diseminación del virus (Palucka y Banchereau, 2002; Glew y col., 2003). Esta fuerte respuesta de IFN tipo I induce una elevación transitoria de los niveles séricos de las proteínas de fase aguda, como la haptoglobina y la amiloide A sérica, siendo sobretodo la primera un indicador de la gravedad de la infección. Esta respuesta innata

es seguida de una respuesta inmune adaptativa que se ve reflejada en la producción de anticuerpos (Müller-Doblies, 2004).

4.4.8. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por el vDVB puede ser complejo debido al lapso de tiempo entre la infección y el inicio de los signos clínicos. Mientras que la detección de animales PI es sencilla con los métodos de diagnóstico actuales, la detección de infecciones agudas y del vDVB en materiales reproductivos puede ser más difícil (OIE, 2018b).

En el caso de los animales con infecciones agudas el diagnóstico se dificulta ya que, a diferencia de los animales PI, estos excretan cantidades relativamente bajas de virus y durante un corto periodo de tiempo (unos 7 a 10 días aproximadamente), sumado a que los signos clínicos pueden aparecer durante las últimas fases de la viremia, lo que reduce aún más el periodo de tiempo durante el cual se puede detectar el virus. En estos animales puede utilizarse RT-PCR (PCR con retrotranscriptasa reversa) en tiempo real para la detección del ARN viral, teniendo esta técnica como ventaja su alta sensibilidad. Dados los bajos niveles de virus, no suele ser práctico realizar el aislamiento del virus a no ser que se necesite para caracterizar la cepa involucrada. Se pueden realizar pruebas serológicas, como el ELISA (Lértora, 2003) y la Inmunofluorescencia indirecta, utilizando muestras pareadas de suero que se hayan tomado en la fase aguda y en la fase de convalecencia, dando lugar a una alta probabilidad de diagnosticar o excluir la infección por el vDVB. La confirmación de que un aborto, la presencia de nacidos muertos o la muerte perinatal se deban al vDVB suele ser difícil de establecer ya que el tiempo entre la infección inicial y la muerte o expulsión del feto puede ser prolongado (OIE, 2018b).

La detección de animales PI solía basarse en gran medida en el aislamiento del virus en cultivos celulares, sin embargo hoy en día se utilizan mucho el ELISA para detección de antígeno y el RT-PCR en tiempo real, ya que ambas técnicas tienen una sensibilidad relativamente alta y a lo laborioso y caro que resultan las técnicas de aislamiento viral e Inmunohistoquímica (OIE, 2018b). En terneros menores a 4 o 5 meses, el aislamiento del virus a partir de sangre puede fracasar debido a la presencia de anticuerpos maternos contra el mismo. En animales de más edad y con viremia persistente, puede haber niveles de anticuerpos bajos debido a su capacidad de seroconvertir frente a cepas del vDVB antigénicamente distintas a la que causa la

viremia persistente, incluyendo cepas vacunales (Brownlie, 1990). Para confirmar un diagnóstico de infección persistente, los animales deben volver a estudiarse pasadas al menos 3 semanas, analizando muestras de sangre para comprobar si contienen el virus y si se ha producido seroconversión.

En el caso de la enfermedad de las mucosas, para su confirmación es necesario el aislamiento del biotipo CP del virus, el cual en ocasiones puede aislarse de la sangre, pero puede recuperarse con más probabilidad de otros tejidos como el bazo, intestino y las placas de Peyer (OIE, 2018b).

5. HIPÓTESIS

Los animales infectados con el virus de la Leucosis Bovina Enzótica (BLV) y/o expuestos al virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) tienen una mayor probabilidad de reaccionar positivamente a la prueba de tuberculina utilizada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar la posible asociación existente entre la infección previa con el virus de la Leucosis Bovina Enzótica y la Diarrea Viral Bovina, con la presencia de animales positivos a la prueba anocaudal de tuberculina en un establecimiento lechero del Uruguay.

6.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos para el virus BLV en muestras de animales positivos y negativos a la prueba de la tuberculina.
- Determinar la presencia de anticuerpos para el virus de DVB en muestras de animales positivos y negativos a la prueba de la tuberculina.
- Determinar el número de leucocitos y linfocitos totales en sangre de las muestras extraídas.
- Relacionar la presencia de anticuerpos contra ambas enfermedades virales en los grupos de animales positivos y negativos a la prueba de la tuberculina.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Caracterización del establecimiento

Los animales utilizados en este trabajo pertenecen a un establecimiento lechero ubicado en el departamento de Florida. La empresa cuenta con distintas unidades de alta producción, en el caso de estos bovinos se encontraban en un sistema de producción de base pastoril.

Este predio en particular se encuentra interdicto, tal como lo exige la reglamentación vigente en la lucha por la erradicación de la Tuberculosis, ya que es un predio foco. Actualmente se realiza un plan sanitario para el control de la enfermedad, con la realización de *screening* por PAC (recría y hembras adultas) cada 4 o 6 meses, segregación de rodeo positivo y eliminación de los mismos y la pasteurización de la leche con que se alimenta a los terneros de la guachera. Además, se realiza un seguimiento en planta de faena y cultivos bacteriológicos e histopatología en el laboratorio oficial (DILAVE) a partir de muestras de animales que presentan lesiones.

Se partió de una prevalencia inicial de un 2,6% de animales reaccionantes positivos a la PAC en todo el rodeo al inicio del proyecto, siendo este número significativamente mayor al promedio nacional en rodeos lecheros de 0,24% (M.G.A.P. 2019).

7.2. Toma de muestras

Los protocolos experimentales para los estudios a realizarse en este trabajo fueron aprobados por Comisión Honoraria de Experimentación animal (CHEA)-Universidad de la República Oriental del Uruguay (número de aprobación 1007).

Se utilizaron muestras de sangre extraídas de la vena coccígea de un total de 329 bovinos hembra de raza Holando, seleccionadas por muestreo dirigido (no probabilístico), de las cuales 154 fueron positivas a la PAC y posteriormente sacrificadas. Las muestras fueron obtenidas en tubos con y sin anticoagulante (EDTA), se refrigeraron y se almacenaron a -20 °C respectivamente.

7.3. Detección de anticuerpos contra BLV mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Para el diagnóstico de BLV se detectaron anticuerpos anti gp51 en suero mediante ELISA. Se utilizó un kit comercial para detectar anticuerpos contra BLV en suero bovino con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad 0728-RD, IDEXX Laboratories, INC. USA), aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

7.4. Detección de anticuerpos contra DVB mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Para el diagnóstico de DVB se detectaron anticuerpos anti p80 mediante ELISA en suero. Dicha proteína es indicativa de infección viral y está recomendado para su uso aún en animales que han sido vacunados. Se empleó un kit comercial con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad. Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

7.5. Detección de antígeno del vDVB mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

A los animales que no se detectaron anticuerpos anti p80 (n=14), se les realizó un ELISA en suero para detección de antígeno del vDVB. Se empleó un kit comercial con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

7.6. Hemograma

En muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) refrigeradas se determinó el número de leucocitos totales y linfocitos en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria en Montevideo, mediante el uso de Mythic 18 vet (Orphée). Los valores normales para el número de leucocitos totales se establecieron entre

4000-12000 leucocitos/microlitro de sangre y para el número de linfocitos el rango de 2500-7500 linfocitos/microlitro de sangre (Veterinary Diagnostic Laboratory, Oregon State University).

7.7. Elaboración de registros y análisis estadísticos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos mediante el empleo de Microsoft office Excel mediante la elaboración planillas donde se identificó correctamente cada muestra con el número individual de trazabilidad y el resultado para las tres enfermedades expresado como positivo o negativo.

Para el análisis estadístico se aplicó la Prueba de Chi² comparando las variables BLV y DVB según el estatus de TB, utilizando el software STATAv14.

8. RESULTADOS

Del total de animales muestreados (n=329), se realizaron pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra BLV en 324, siendo positivos 262 (80,8%). Cuando se relacionó esta infección viral con TB, se observó que de 150 positivas a PAC, 109 animales (72,7%) presentaron anticuerpos contra BLV y de las 174 vacas negativas a la PAC, 153 (87,9%) fueron seropositivas a BLV; encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad a BLV y la reacción negativa a PAC ($p=0.000$).

Del total de animales a los que se le realizó serología contra DVB (n=324), 310 de ellos (95,7%) resultaron positivos. Por otra parte, se detectaron anticuerpos contra DVB en 142 (94,7%) animales de los 150 positivos a la PAC y en 168 (96,6%) animales de 174 negativos a la PAC. El porcentaje de animales seropositivos a DVB es mayor en los animales negativos a la PAC que en los animales positivos, pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p=0.405$).

A los 14 animales que resultaron serológicamente negativos a DVB se les realizó un test de ELISA para antígeno buscando la presencia de animales PI, sin obtenerse resultados positivos.

Tabla 1. Estatus serológico contra el Virus de Leucosis Bovina Enzoótica (BLV+/BLV-) y el Virus de Diarrea Viral Bovina (DVB+/DVB-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes. n= 324 (animales a los que se le realizó serología contra DVB, BLV y hemograma).

	DVB+	DVB-	BLV+	BLV-
PAC+	142 (43,8%)	8 (2,5%)	109 (33,6%)	41 (12,7%)
PAC-	168 (51,8%)	6 (1,9%)	153 (47,2%)*	21 (6,5%)

* $p<0.05$

Del total de los animales estudiados (n=329), debido a problemas durante el muestreo se pudo realizar hemograma a 229 para determinar el número de leucocitos y linfocitos totales por microlitro (μL) de sangre, obteniéndose los siguientes resultados: sobre los leucocitos totales, 99 animales (43%) presentaron leucocitosis, mientras que 130

(57%) tuvieron valores normales (entre 4000 y 12000 leucocitos/ μ L). En cuanto a los linfocitos, 116 animales (50,6%) presentaron linfocitosis, 112 (49%) presentaron valores normales (entre 2500 y 7500 linfocitos/ μ L) y un animal (0,4%) presentó linfopenia.

De los 224 animales a los que se les realizó serología contra BLV y hemograma, 49,5% (111 animales) presentaron linfocitosis y de los 176 animales que fueron seropositivos a BLV y se les realizó hemograma, el 48% (85 animales) presentaron linfocitosis en una única determinación.

Tabla 2. Estatus leucocitario (Leucocitosis+/Leucocitosis-) y linfocitario (Linfocitosis+/Linfocitosis-) en relación al estatus serológico contra el Virus de Leucosis Bovina Enzoótica (BLV+/BLV-) expresado en valores absolutos y porcentajes. n= 224 (animales a los que se le realizó serología contra BLV y hemograma).

	Leucocitosis +	Leucocitosis -	Linfocitosis +	Linfocitosis -	Linfopenia
BLV +	73 (32,6%)	103 (46,0%)	85 (38%)	90 (40,2%)	1 (0,4%)
BLV -	21 (9,4%)	27 (12,0%)	26 (11,6%)	22 (9,8%)	0 (0%)

Tabla 3. Estatus leucocitario (Leucocitosis+/Leucocitosis-) y linfocitario (Linfocitosis+/Linfocitosis-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes. n= 229 (animales a los que se le realizó PAC y hemograma).

	Leucocitosis +	Leucocitosis -	Linfocitosis +	Linfocitosis -	Linfopenia
PAC+	58 (25,3%)	67 (29,3%)	71 (31,0%)*	54 (23,6%)	0
PAC-	41 (17,9%)	63 (27,5)	45 (19,7%)	58 (25,3%)	1 (0,4%)

*p<0.05

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no permiten confirmar la hipótesis planteada al comienzo del mismo, por lo que no se podría afirmar que existe una asociación entre la infección por una enfermedad viral inmunosupresora (BLV/DVB) y una mayor probabilidad de reaccionar positivamente a la PAC para el diagnóstico de TB.

No fue posible demostrar bajo las condiciones de este estudio y con las técnicas diagnósticas empleadas (serología para detección de anticuerpos contra DVB y BLV y reacción a PPD en PAC) el orden temporal de las enfermedades infecciosas estudiadas. Se puede inferir que hubo exposición viral y reacción positiva a *Mycobacterium spp*, pero no se pudo determinar qué infección ocurrió primero, lo que dificulta la posibilidad de comprobar la influencia que cada una de ellas tendría sobre las demás. Esto representa una de las mayores limitantes de este trabajo a la hora de demostrar la hipótesis planteada.

Por otro lado, se debe remarcar que debido al tipo de muestreo que se utilizó, muestreo dirigido (no probabilístico), no se puede extrapolar la representatividad de la muestra. Esta muestra no representa la variabilidad de la población, lo que es el mayor inconveniente del método utilizado (Casal y Mateu, 2003). Por lo tanto, esto debe ser tenido en cuenta a la hora de realizar una comparación con los datos presentados en otros estudios realizados a nivel nacional en los que se buscaban, entre otros, la prevalencia de estas enfermedades.

En este trabajo se describen los resultados de seroprevalencia de dos enfermedades infecciosas de interés para el país, a partir de muestras provenientes de animales en plena producción lechera y provenientes de un tambo “tipo” del Uruguay. Se obtuvieron como resultados una seroprevalencia de BLV a nivel de la muestra de 81%, siendo muy similar a lo obtenido en el trabajo publicado por Riet y col. en el año 2019, donde a nivel nacional encontraron prevalencias de 82% de BLV en tambos con más de 250 vacas.

A pesar de que BLV es una enfermedad prioritaria para el país y que se tiende a realizar una búsqueda de estrategias nacionales de control, se podría decir que estas han sido escasas en comparación a las realizadas por países con estrategias y requisitos más estrictos como Nueva Zelanda, Noruega, España, Suiza, Suecia, Eslovenia, Reino Unido, Holanda, Polonia y Australia. Estos países presentaban baja prevalencia y lograron eliminar el virus en base a la identificación y eliminación de animales positivos (Riet y col., 2019). Al haber restricciones en la exportación de ganado en pie, como las que realiza nuestro país a China, exclusivamente si los animales son seronegativos a la virosis, quedan en el territorio nacional los animales seropositivos, los cuales aumentan la diseminación viral en el rodeo vacuno uruguayo. En nuestro país, el equipo de investigación del Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria UdelaR, ha presentado diferentes trabajos donde se concluye que BLV afectaría indirectamente la performance reproductiva de los rodeos, y por lo tanto la performance productiva, ya que facilitaría el ingreso de determinados patógenos que afectan al aparato reproductor de los animales (Puentes y col., 2016a; Mionetto y Rodriguez, 2018). Además, estudiaron la respuesta inmune humoral producida por la vacunación contra el virus de la Fiebre Aftosa (Puentes y col., 2016b) y contra *Clostridium perfringens* (De Brun y col., 2019) en animales seropositivos y seronegativos al BLV. Al inmunizar contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis, se encontró una respuesta más baja en los títulos de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa en los bovinos infectados con BLV, pero lo mismo no se observó en los anticuerpos totales para ese virus (VFA) y contra las toxinas del *Cl. perfringens*.

En lo referido a DVB, se obtuvo una prevalencia del 96% de animales positivos a nivel de la muestra, lo que representa un porcentaje significativamente mayor al obtenido por Guarino en el 2001, quien realizó un estudio serológico sobre 6358 bovinos de carne de nuestro país e indicó que el 69% eran seropositivos al virus, y a lo presentado por Da Silva en el 2019, quien informó que el 80,9% de 1438 bovinos provenientes de 102 tambos evaluados fueron seropositivos al virus. El diagnóstico de laboratorio, que consistió en la búsqueda de anticuerpos contra la proteína p80, es una herramienta útil para evaluar la exposición viral natural, ya que no interfiere con la vacunación que se realiza en el predio. Este método detecta un tipo de anticuerpos contra la proteína p80, la cual es sintetizada por el virus cuando este se replica, por lo que estos anticuerpos sólo estarán presentes si existió multiplicación del virus en el animal, lo

que ocurre únicamente durante la infección natural (Martínez Bello, 2006); debido a lo que se puede sugerir que existe circulación viral en el rodeo estudiado, lo que puede ocurrir por ejemplo en presencia de animales P.I. que no han sido detectados y diseminan el virus en el rodeo. En el presente estudio ninguno de los animales negativos a las pruebas serológicas resultó positivo al realizarse ELISA para detección de antígeno, descartándose de esta forma que se tratara de animales PI.

En este trabajo se realizó un recuento leucocitario y linfocitario por microlitro de sangre de cada animal para obtener un dato real sobre la presencia de linfocitosis en vacas seropositivas y seronegativas a BLV, resultando en que de 176 animales que resultaron seropositivos a BLV y se les realizó hemograma, 85 (48%) presentaron linfocitosis y de 62 animales seronegativos a BLV, 26 (42%) presentó linfocitosis. Si bien para que la linfocitosis sea considerada persistente, esta debe presentarse en 2 muestras analizadas separadas en el tiempo por un periodo de 60 a 90 días (Bendixen, 1963) y esto no fue posible de realizar en este trabajo, se puede concluir que del total de los animales a los que se le realizó hemograma ($n=229$), 116 (50%) presentaron un elevado número de linfocitos en sangre. Por lo tanto, se podría inferir que estos animales pueden sufrir un desorden inmunológico con un desbalance en las poblaciones linfocitarias y por ende, afectarse el perfil de la respuesta de linfocitos TCD4+ (Kabeya y col., 2001).

Al momento del análisis estadístico, mediante el empleo del Chi², se observó una asociación positiva entre la presencia de linfocitosis y la reacción positiva a la PAC ($p<0,05$). En este trabajo se obtuvo que un 48,3% de los animales seropositivos a BLV a los que se le realizó hemograma presentaron linfocitosis ($n=176$). Como ya mencionamos, para definir una linfocitosis persistente causada por BLV se deben analizar dos muestras separadas en el tiempo por un período de entre 60 y 90 días, por lo tanto, al realizarse en este trabajo un único hemograma, no podemos definir la linfocitosis persistente obtenida en los resultados como tal; sin embargo cabe señalar que la proporción de linfocitosis obtenida dentro de los animales seropositivos a BLV se encuentra dentro del rango de entre 30 y 70% descripto para linfocitosis persistente en el manual terrestre de la OIE (OIE, 2018a), aunque no puede descartarse que la presencia de enfermedades concurrentes tales como mastitis, bronquitis o enfermedades podales, afecten de forma relevante el conteo de linfocitos (Rama y col., 2010). Esta relación entre la linfocitosis, causada o no por la infección por BLV y

la reacción positiva a la PAC podría ser un muy interesante objeto de investigación para futuros trabajos que puedan complementar lo aquí presentado.

En el Uruguay, no hay trabajos de investigación que hayan tenido como foco la interacción entre estas dos enfermedades virales y la TB. Por lo tanto, esta es la primera aproximación en esta temática e intentará contribuir a la resolución de problemas sanitarios relevantes para el país a nivel productivo.

Con respecto a la interacción entre BLV y *Mycobacterium bovis*, Lützelshwab y col. (2016), hace hincapié en que los efectos de la infección por BLV y los disturbios inmunológicos que esta genera pueden predisponer a la tuberculosis bovina, así como es el caso del VIH en humanos, por lo que puede haber una coinfección y una potencial interacción entre BLV y *Mycobacterium bovis* en predios que estén enfocados en la producción vacuna y tengan presentes ambos microorganismos. Estos autores demostraron que la infección previa por tuberculosis no afectó la resistencia genética al BLV, lo que va en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, Sledge y col. (2009) reportaron un caso de coinfección entre *Mycobacterium bovis* y BLV en una vaca Holando de 9 años de edad en Michigan, Estados Unidos. El animal fue reaccionante positivo a un test cutáneo para el diagnóstico de TB, lo que luego fue confirmado mediante una prueba de Interferón-Gamma, observación histológica de bacilos ácido alcohol resistentes y cultivo bacteriano; además de presentar lesiones histológicas compatibles con TB y linfoma, siendo la infección por BLV confirmada por PCR.

En humanos, existen varios reportes de coinfección entre el HTLV-1 (Virus Linfotrópico de Células T Humano, fuertemente emparentado al BLV) y *Mycobacterium spp.*, sugiriéndose un aumento en el riesgo de padecer tuberculosis en las personas infectadas por este virus (Marsh, 1996; Marinho y col., 2005; Verdonck y col., 2007). Se cree que este aumento en la susceptibilidad a las infecciones por micobacterias se debe a la inmunosupresión causada por el virus, particularmente relacionada a la inmunidad mediada por linfocitos T, que es la principal respuesta inmune a la infección por estos microorganismos (Marinho y col., 2005; Verdonck y col., 2007). Esta es una de las principales diferencias entre la infección por el HTLV y por el BLV, cuyas principales células blanco son los linfocitos B (Gillet y col., 2007).

En cuanto al vDVB, se detectaron anticuerpos contra el mismo en el 95% de los animales positivos y 97% de los negativos a la PAC, no obteniendo resultados de relevancia al intentar relacionar ambas enfermedades, lo que se podría atribuir a la muy alta prevalencia de esta infección viral en la muestra. Distintos autores se han enfocado en demostrar y describir una posible asociación entre esta infección viral y la producida por el *Mycobacterium bovis*. Monies y Head (1999) describieron un brote severo de TB en ganado estabulado que fue asociado a una infección concurrente con DVB; Charleston y colaboradores (2001) utilizaron cinco terneros gnotobióticos, de los cuales algunos fueron expuestos a la vacuna BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*, utilizada en humanos para proporcionar inmunidad contra la Tuberculosis) y otros a la vacuna BCG y posteriormente a una cepa NCP del vDVB, para posteriormente cuantificar la respuesta inmune producida por estos terneros al enfrentarse a dos tipos diferentes de PPD (uno de *Mycobacterium bovis* y otro de *Mycobacterium avium*). Mediante el estudio de dos parámetros sanguíneos, la proliferación linfocitaria y la producción de INF γ , concluyeron que la infección aguda por este virus puede comprometer temporalmente la respuesta inmune de los animales infectados; por otro lado Kao y colaboradores (2006) realizaron una comparación en las características de eliminación del *Mycobacterium bovis* en 12 terneros, 6 infectados únicamente con la micobacteria y 6 coinfectados con *Mycobacterium bovis* y con el vDVB, utilizando modelos simples de replicación bacteriana y concluyeron que, aunque encontraron cierta evidencia de que podría existir una diferencia entre ambos grupos, esta no resultó ser estadísticamente significativa. Finalmente, Byrne y colaboradores (2017) realizaron un estudio en Irlanda del Norte en el que utilizaron 2827 establecimientos que cumplían los criterios de presentar por lo menos 5 animales positivos a DVB en un año y de realizar tests para el diagnóstico de esta enfermedad en por lo menos el 80% de los animales nacidos por año, comparándolos con el total de los establecimientos en Irlanda del Norte ya que este país se encuentra bajo campaña para la erradicación de la TB en la cual se realiza PCC para el diagnóstico de esta enfermedad en todos los establecimientos del país. Estos autores encontraron una asociación positiva significativa univariable entre el estatus de DVB y el número de animales positivos a PCC, confirmándose el estatus de TB mediante *spoligotyping*, pero sin encontrar una asociación significativa entre el estatus de TB y el estatus de DVB al utilizar modelos finales multivariados en los que se controlaron otros factores

de confusión importantes, como el tamaño del rodeo, el número de tests contra DVB realizados y el número de animales que ingresan al rodeo por año.

La PAC para el diagnóstico de TB se basa en una reacción de hipersensibilidad tipo IV. Esta reacción ocurre en animales que han sido sensibilizados al antígeno (expuestos a *Mycobacterium bovis*) y su desencadenamiento puede dividirse en diferentes fases. La primera fase del desencadenamiento de la reacción es el reconocimiento del antígeno, en este caso el PPD, quien es captado por las células presentadoras de antígenos y presentado a los clones de linfocitos Th1 de memoria específicos para el mismo que fueron generados en la primera exposición del animal a la micobacteria. La siguiente fase de este proceso se denomina activación y es representada por la activación de estos linfocitos Th1 de memoria, quienes comenzarán a secretar ciertas citoquinas como interferón gamma, interleuquina 2 y factor de necrosis tumoral alfa causantes, entre otros efectos, de una amplificación de la respuesta inmune y la activación de los macrófagos, células encargadas de llevar a cabo la última fase de esta reacción de hipersensibilidad denominada fase efectora, que resultará en la inflamación dérmica observada en esta prueba (Tizard, 2000; Casal y col 2016; Crosi 2017). Según Snider (1982) y Crosi (2017), hay varios factores que contribuyen a la presencia de falsos negativos en pruebas de hipersensibilidad como la PAC, entre quienes se encuentran las enfermedades virales, debido a que estas pruebas de diagnóstico evalúan la respuesta inmune celular del hospedador y toda situación en la vida del animal que afecte su sistema inmunológico puede comprometer el rendimiento de las pruebas. Charleston (2001) y Kao y col. (2006) nombran en sus trabajos la infección concomitante entre vDVB y *Mycobacterium bovis* como una causa para la presencia de animales falsos negativos a la PAC para el diagnóstico de la TB.

Según los resultados obtenidos por este trabajo, el 71% de los bovinos positivos a PAC estaban infectados por BLV, mientras que de los negativos a PAC en el 87% se detectaron anticuerpos contra BLV. Se observó, inversamente a lo esperado, una asociación significativa entre la seropositividad a BLV y la no reacción a la PAC. Conociendo la patogenia de BLV, se puede inferir que aquellos animales seropositivos a esta virosis asintomáticos, ya sea aleucémicos y/o con linfocitosis persistente, presentan alteraciones en su sistema inmune (Kabeya y col., 2001), por lo que se sugeriría que esta asociación se debe a la presencia de animales falsos negativos a

la PAC, debido a que la respuesta inmune de los mismos se encuentra comprometida por la infección del BLV.

Teniendo en cuenta el papel que juegan estas enfermedades virales inmunosupresoras en la alteración del sistema inmune de los animales, favoreciendo la aparición de otras enfermedades infecciosas, y la alta prevalencia de las mismas encontrada en nuestro estudio, cabría lugar a analizar y profundizar el rol que estas juegan en la gran dificultad que el establecimiento está teniendo en poder controlar y eventualmente llegar a erradicar la TB, pudiendo ser esta una causa para el fracaso de las diferentes estrategias que desde hace varios años se están llevando a cabo en para este fin.

En conclusión, este trabajo presenta los resultados de prevalencia de tres enfermedades infecciosas (TB, BLV, DVB) y el número de leucocitos y linfocitos en sangre de 229 animales provenientes de un predio lechero del Uruguay; resultando en una asociación entre la seropositividad a BLV y la no reacción a la PAC para el diagnóstico de TB y entre la reacción positiva a PAC y la presencia de linfocitosis. A partir de los resultados, más investigaciones deben ser realizadas buscando confirmar los mismos y profundizar en campañas y estrategias de control y erradicación de estas enfermedades, pudiéndose discutir si DVB y BLV contribuyen a falsear los resultados de la reacción a la PAC en bovinos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1-Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2012). Inmunología celular y molecular. 6ª edición. Elsevier, Barcelona. 574 p.
- 2-Baker JC. (1987). Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190:1449-1458.
- 3-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.
- 4-Bartlett, 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.
- 5- Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *JournalofDairyScience*, 96: 1591–1597.
- 6-Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 2a ed. Paris, Ed. OIE, p. 723-738.
- 7-Bendixen, H.J. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: Leukosis Enzootica bovis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 108:1241-1267.
- 8-Betancur, C., Rodas, J. (2008). Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev. MVZ Córdoba*. 13(1):1197-1204.

- 9-Biberstein, E. L.,Hirsch,D.C. (1999). *Mycobacterium* species: The agents of Animal Tuberculosis. En: *Veterinary Microbiology*, Blackwell Science Ltd, p 158-164.
- 10- Bolin SR, Ridpath JF (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53:2157–2163.
- 11- Brownlie J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 43–59.
- 12- Byrne, AW, Guelbenzu-Gonzalo, M, Strain, SAJ, McBride, S, Graham, J, Lahuerta-Marin, A, Harwood, R, Graham, DA, 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.
- 13- Canal A. M. (2013). Tuberculosis bovina: vigilancia epidemiológica en mataderos de la Provincia de Santa Fe (Argentina) y evaluación de la respuesta inmune en lesiones granulomatosas de animales infectados. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Madrid, España. 185 p.
- 14- Carrisoza-Urbina J, Morales-Salinas E, Bedolla-Alva MA, Hernandez-Pando R, GutierrezPabello JA (2019). Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. *PloS ONE*, 14(7):e0218547.
- 15- 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. *Pesq. Agrop. Gaúcha* 4:35-38.
- 16- Casal C. (2016). Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España. 279 p.

- 17- Casal, J., Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. Rev. Epidem. Med. Prev., 1: p 3-7.
- 18- Casas Olascoaga, R. (2013). Antecedentes de la Tuberculosis Bovina en el Uruguay. Período 1888-1998. Seminario sobre Sanidad Animal. DILAVE "Miguel C. Rubino". Veterinaria (Montevideo) 49: 14 - 30.
- 19- Casaux G (2005). Tambos Manual de legislación láctea. 3a ed. Montevideo Oficina de Publicaciones de la Facultad de Veterinaria, V1, 31 p.
- 20- Center for Food Security & Public Health (CFSPH) - Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB) (2009). Bovine Tuberculosis. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. 6p. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/>. Fecha de consulta: 4 de Noviembre, 2020.
- 21- Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. REDVET. 6(7):2-25.
- 22- Charleston, B., Hope, J. C., Carr, B. V., & Howard, C. J. (2001). Masking of two in vitro immunological assays for Mycobacterium bovis (BCG) in calves acutely infected with non-qctopathic bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Record, 149(16), 481–484. doi:10.1136/vr.149.16.481
- 23- Collazo, L., Sienna, R., Irabuena, O., Guarino, H., Navarro, M., Lavarello, L. (2002). Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado lechero. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p. 322-325.
- 24- Crosi G. (2017). Evaluación de las pruebas de tuberculina y del test de interferón-gamma para el diagnóstico de la tuberculosis bovina y su manejo en los programas de control prueba-sacrificio. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, Udelar. p 112.
- 25- Da Silva Silveira, Caroline (2019). Enfermedades Infecciosas que Causan Abortos en Bovinos con Enfoque en Rodeos Lecheros de Uruguay. Tesis de Doctorado, facultad de Veterinaria UdelaR. p 46.

- 26- De Brun, L., Algorta, A., Alvarez, J.P., Puentes, R. (2014). Transmisión de la Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p 195-196.
- 27- De la Rúa-Domenech R., Goodchild A. T., Vordermeier H. M., Hewinson R. G., Christiansen K. H., Clifton-Hadley R. S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet. Sci.*, 81 (2): 190-210.
- 28- De la Sota, M.D. (2004). 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: 11 de Noviembre, 2020.
- 29- Deregt D, Loewen KG. (1995). Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 36:371–377.
- 30- Detilleux JC, Freeman AE, MillerLD. (1991). Comparison of natural transmission of bovine leukaemia virus in Holstein cows or two genetic lines selected for high and average milk production. *Amer. J Vet Res.* 52(9):1551- 1559.
- 31- DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet. Med.* 87(3):263-271.
- 32- Dimmock CK, Chung YS, Mackenzie AR. (1991). Factors affecting the Natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy Herd. *Austr.Vet.J.* 68(7):230-233.
- 33- Dohms, J. E. y Saif, Y. M. (1984). Criteria for Evaluating Immunosuppression. *Avian Diseases*, Vol. 28, p 305-310.

- 34- Donis R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vete Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 11: 393-423.
- 35- Drake T.R.; Moore D.A.; Whitlock R.H.; Castro A.E.; Hat-tel A.I.; Reams R.; Stoffregen W. (1996). An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 208
- 36- Dubovi EJ (1994). Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clinic. Of N.A. Food Anim. Pract.* 10:503–514.
- 37- Elfaki, M., Al-Hokail, A., Kambal, A. (2012). Microbial immunosuppression. En: *Immunosuppression: Role in Health and Diseases*, InTech, Croacia. p 215 – 224.
- 38- Emanuelson, U. Scherlinga, K., Petterssonc, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 12: 121-131.
- 39- Evermann, JF, Jackson, MK. (1997). Laboratory diagnostic test for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet.Clin. North Am Food Anim Pract.* 13(1):87-106.
- 40- 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.
- 41- Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studdert, M., White, D. (1992). *Retroviridae*. En: Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studdert, M., White, D. *Virologia Veterinaria*. Zaragoza. Acribia. p. 571- 600.
- 42- Ferrer, J.F. Piper, C.E. (1981). Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer. Res.* 41: 4906–4909.

- 43- Ferrer, J.F., Piper, C.E. (1978). An Evaluation of the Role of Milk in the Natural Transmission of BLV. *Ann Rech Vet.* 9(4): 803-807.
- 44- Fischer EAJ, van Roermund HJW, Hemerik L, van Asseldonk MAPM, de Jong MCM (2005). Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. *Preventive Veterinary Medicine* 67:283-301.
- 45- Florins, A., Gillet, N., Asquith, B., Boxus, M., Burteau, C., Twizere, J.C., Urbain, P., Vandermeers, F., Debacq, 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.
- 46- Fray MD, Paton DJ, Alenius S. (2000). The Effects of Bovine Viral Diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60– 61:615–627.
- 47- Frie, M. y Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(3-4), 103–114.
- 48- 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 182, p125-135.
- 49- Furtado, A., Rosadilla, D., Franco, G., Piaggio, J., Puentes, R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria.* 49(191):29-37.

- 50- García F., Calderón A., Almansa J., Garzón C., Márquez D., Jiménez G., Jaramillo F. (2000). Efectos de la infección por el virus de la leucosis bovina sobre la producción y reproducción en un hato lechero. *Rev. FMVZ.* 47(2):39-44.
- 51- Garro, C., Delgado, F., Zumárraga, M., Marfil, J., Garbaccio, S., (2018). Mastitis tuberculosa en bovinos de leche: reporte de casos. Instituto de Patobiología. CICVyA - INTA. 2. Instituto de Biotecnología. CICVyA – INTA. XXII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD), Río Cuarto, Córdoba.
- 52- Gethmann, J., Probst, C., Bassett, J., Blunk, P., Hövel, P. y Conraths, F.J. (2019) An Epidemiological and Economic Simulation Model to Evaluate Strategies for the Control of Bovine Virus Diarrhea in Germany. *Frontiers in Veterinary Science*, 6.
- 53- Gil, A. (2012). Tuberculosis Bovina: Enfermedad Reemergente en poblaciones bovinas de América: La experiencia Uruguay a marzo 2012. Disponible en: <http://sapuvetnet.org/News%20Imas/2.4.%20Tuberculosis%20bovina%20enfermedad%20reemergente%20en%20poblaciones%20bovinas.pdf>. Fecha de consulta: 26 de Abril, 2020
- 54- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A., 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.
- 55- Glew, E., Carr, B., Brackenbury, L., Hope, J., Charleston, B., & Howard, C. (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *The Journal of general virology*, 84 Pt 7, 1771-80.
- 56- González, E.T., Olivia, G.A., Varela, A., Bonzo, E., Licursi, M., Etcheverrigaray, M.E. (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID,

ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.

57- Gross, W. B. y Siegel, P. B. (1982). Socialization as a factor in resistance to infection, feed efficiency, and response to antigen in chickens. *American Journal of Veterinary Research* 43, 2010.

58- Guarino H, Saizar J, Sienna R. (1989). Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. XVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.c.c.4:1-7.

59- Guarino, H, Núñez, A, Repiso, MV, Gil, A, Dargatz, DA (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*, 85 (1- 2): 34-40.

60- Guarino, H, Núñez, A. (2001). Enfermedades virales de la reproducción. XXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Uruguay, p 72-75.

61- Guarino, H. (2001). Plan Piloto de monitoreo en lechería. Principales enfermedades infecciosas en la cuenca lechera de Florida. *Rev. Plan Agrop.* 96:46-48.

62- Gutiérrez, G. (2010). Estudio de la dinámica de la infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

63- Habarugira, G., J. Rukelibuga, M. O. Nanyingi and B. Mushonga, 2014: Bovine tuberculosis in Rwanda: Prevalence and economic impact evaluation by meat inspection at Société des Abattoirs de Nyabugogo-Nyabugogo Abattoir, Kigali. *Journal of the South Africa veterinary association*, 85, 1062.

- 64- Henken, A. M., Groote Schaarsberg, A. M. J. y Nieuwland, M. G. B. (1983). The Effect of Environmental Temperature on Immune Response and Metabolism of the Young Chicken. 3. Effect of Environmental Temperature on the Humoral Immune Response Following Injection of Sheep Red Blood Cells. *Poultry Science*, 62(1), 51–58.
- 65- Hopkins, S.G., DiGiacomo R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 13:107-128.
- 66- Houe H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clinic. Of N.A. Food Anim. Pract.* 11:521–547.
- 67- Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microb.* 64: 89-107.
- 68- Huber, N.L., DiGiacomo, R.F., Evermann, J.F., Studer, E. (1981). Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am. J. Vet. Res.* 42(9):1477-1481.
- 69- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2019a). Bovine leukemia virus. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19760530&src=NCBI&ictv_id=19760530. Fecha de consulta: 19 de octubre, 2020.
- 70- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2019b). Genus: Pestivirus. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus. Fecha de consulta: 19 de octubre, 2020.
- 71- Irureta M (2016). Tuberculosis bovina: actualización sobre la enfermedad y la campaña sanitaria en Uruguay. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 80 p.

- 72- Jacobs, M., Franklin, L., McNab, W.B., Jefferson, B. (1995). A Serological Survey of Bovine Syncytial Virus in Ontario: Associations With Bovine Leukemia and Immunodeficiency-Like Viruses, Production Records, and Management Practices. *Can. J. Vet. Res*; 59(4): 271-278.
- 73- Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62:287-312.
- 74- 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.
- 75- Kale, M., Bulut, O., Yapkic, O., Gulay, M.S., Pehivanoglu, F., Ata, A., Yavru, S. (2007). Effects of subclinical bovine leukemia virus infections on some production parameters en a dairy farm in southern Turkey. *Tdyskr. S. Afr. Vet. Ver.* 78(3):130-132.
- 76- Kao, R.R., Gravenor, M.B., Charleston, B., Hope, J.C., Martin, M., Howard, C.J., 2007. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J. Roy. Soc. Interface*, 4, 545-551.
- 77- Kelling CL (1996). The effects of BVDV infection on cattle. *Vet. Med.* 91:862– 863.
- 78- Konnai, S., Murata, S. y Ohashi, K. (2016). Immune exhaustion during chronic infections in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 79(1): 1–5.
- 79- Lassauzet M.L., Johnson W.O., Thurmond M.C., Stevens F. (1989). Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 53:424-430.
- 80- Lértora W.J. (2003) Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Veto* 14(1): 42-51.
Disponibile en:

http://www.produccionbovina.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/34-diarrea_viral_bovina.pdf fecha de consulta

- 81- 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. p. 123-143.
- 82- Lützel Schwab, C, Agustina Forletti, A, Cepeda, R, Esteban, E, Confalonieri, O, Gutiérrez S (2016). Co-infection with Mycobacterium bovis does not alter the response to bovine leukemia virus in BoLA DRB3*0902, genetically resistant cattle. Research in Veterinary Science 109 10–16
- 83- Mammereckx, M., Portetelle, D., de Clercq, K, Burny, A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. Leuk. Res. 11:353-358.
- 84- Marinho, J., Galvao-Castro, B., Rodrigues, L.C., Barreto, M.L. (2005). Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. J Acquir Immune Defic Syndr 40:625–628.
- 85- Markham, R. J. F. & Ramnaraine, M. L. (1985). Release of immunosuppressive substances from tissue culture cells infected with bovine viral diarrhea virus. American Journal of Veterinary Research 46, 879.
- 86- Marsh B. (1996). Infectious complications of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I infection. Clin Infect Dis 23:138–145.
- 87- Marshak, R.R. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. J. Natl. Cancer Inst. 41:243-263.

- 88- Martín, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., & Gómez-Lucía, E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med, Series B*, 48(2): 97-106.
- 89- Martín, D., Arjona, A., Viana, M., Soto, I., Barquero, N., Gómez-Lucía, E. (2000). Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzoótica. *Med. Vet.* 17:133-141.
- 90- Martínez Bello, D. (2006). BVD Diarrea Vírica Bovina. *Revista de la Federación Frisona Española* N° 154: 98-100.
- 91- Maya, L., Macías-Rioseco, M., Silveira, C. y col (2019). An extensive field study reveals the circulation of new genetic variants of subtype 1a of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. *Arch Virol* 165, 145–156 (2020).
- 92- McCluskey, B.J. (2002). Biosecurity for Arthropod-Borne Diseases. *Vet. Clin. North Amer Food Anim Pract.* 18: 99-114.
- 93- Mederos, A., Irigoyen, D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. XXVI Jorn. Urug. Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 19-20.
- 94- Menzies, F. D. and S. D. Neill, 2000: Cattle-to- cattle transmission of bovine tuberculosis. *Veterinary journal*, 160, 92-106.
- 95- MERCOSUR/GMC/RES N° 9/96. Normas sanitarias para la importación y exportación de animales bovinos y bubalinos entre los estados parte del MERCOSUR. Buenos Aires, 13 p. Disponible en: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_009_096_.PDF

- 96- MGAP- DIEA (2019). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2019>
- 97- Mionetto, M., 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. 49 p.
- 98- Moennig V.; Liess B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 477-487.
- 99- Monaghan M. L., Doherty M. L., Collins J. D., Kazda J. F., Quinn P. J. (1994). The tuberculin test. *Vet Microbiol*, 40: 111-124.
- 100- Monies, R. J. & Head, J. C. S. (1999) Bovine tuberculosis in housed calves. *Vet. Rec.* 145, 743.
- 101- Monke DR, Rohde RF, Hueston WD, Milburn RJ. (1992). Estimation of the sensibility and specificity of the agar gel immunodiffusion test for Bovine Leukemia virus: 1296 cases (1982-1989). *J.Am.Vet.Med.Ass.* 200(12):2001- 2004.
- 102- Muller-Doblies, D., Arquint, A., Schaller, P., Heegaard, P. M. H., Hilbe, M., Albin, S., Abril, C., Metzler, A. (2004). Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 11(2), 302–312.
- 103- Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C., Parsons S, van Helden P.D., Zinsstag J. (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced Tuberculosis in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (6): 899-908.
- 104- Muneer, M. A., Farah, I. O., Newman, J. A., & Goyal, S. M. (1988). Immunosuppression in animals. *British Veterinary Journal*, 144(3), 288–301.

- 105- Nagy, D.W., Tyler, J.W., Kleiboeker, S.B. (2007). Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. *J. Vet. Intern. Med.* 21:1104-1107.
- 106- Neill S. D., Bryson D. G., Pollock J. M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1/2): 79-86.
- 107- Nettleton P.F.; Entrican G. (1995). Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151: 615-642.
- 108- O.I.E. (2020). Tuberculosis Bovina. Disponible en: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/> Fecha de consulta: 23 de Marzo, 26 de Abril y 4 de Noviembre, 2020.
- 109- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal (2018a). Manual terrestre de la OIE. Capítulo 3.4.9. Leucosis Bovina Enzoótica. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.09_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf
- 110- OIE (2018b) Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 3.4.7. Diarrea Viral Bovina. Disponible en https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf. Fecha de consulta: 2/5/2020.
- 111- OMS (2019). Global tuberculosis report 2019. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/global-tuberculosis-report-2019> (2019). Fecha de consulta: 29 de octubre de 2020.
- 112- Orloff, S.L., Wallingford J.C., Mc Dougal J.S. (1993). Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type I in Human Milk: Effects of Intrinsic Factors in Human Milk and of Pasteurization. *J. Hum. Lact.* 9:13-17.

- 113- Palmer M. V. y Waters W. R. (2006). Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet Microbiol*, 112: 181-190.
- 114- Palucka, K., & Banchereau, J. (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 14(4), 420–431.
- 115- Paton DJ (1995). Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 112:215–236.
- 116- Perino, L.J., Wright, R.E., Hoppe, K.L., Fulton, R.W. (1990). Bovine Leukosis Virus Transmission with Mouthparts from *Tabanus Abactor* after Interrupted Feeding. *Am J. Vet Res*, 51(8): 1167-1169.
- 117- Portetelle, D., Dandoy, C., Burny, A., Zavada, J., Siakkou, H., Gras-Masse, H., Drobecq, H., Tartar, A. (1989). Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology*. 169:34-41.
- 118- Potgieter, LND (1995). Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11 (3): 615.
- 119- Pollock, J. M. y S. D. Neill. (2002) *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary journal*, 163, 115-127.
- 120- Pritsch, O. (2010). Estudio comparativo para tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzootica Bovina y análisis del efecto de enfermedades sobre la formula leucocitaria. *Veterinaria*. (Montevideo). 46:177-180.
- 121- Puentes R, De Brun L, Algorta A, Alvarez JP, 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 Animal Health* 4(3):294-309.

- 122- Puentes, R., De Brun, 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.
- 123- Pyeon, D., O'Reilly, K.L., Splitter, G.A. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing on persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70: 5706-5710.
- 124- Radostits, M., Gay, C., Blood, D., Hinchcliff, K. (2002). *Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino.* 9 Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana, Madrid. 2215 p.
- 125- 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. *Revista SMVU, Vol. 46, N° 177-180, p 15-21.*
- 126- Ramírez R, Chavarría B, López A, Rodríguez L, Nevárez A. (2012). Presencia del virus de la diarrea viral bovina y su asociación con otros cuadros patológicos en ganado en corral de engorda. *Veterinaria México, 43(3), 225-234.*
- 127- Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M (2004). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Premio Sociedad de Buiatría del Uruguay 2004. p.11-12.*
- 128- Rhodes JK, Pelzer KD, Johnson YJ, Russek-Cohen E. (2003). Comparison of culling rates among dairy cows grouped on the basis of serologic status for bovine leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc.* 223(2):229- 231.

- 129- 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.
- 130- Riet Correa, F., Monesiglio, C., Pritsch, O. (2019) Leucosis enzoótica bovina en Uruguay: ¿hacia dónde vamos? XLVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. Páginas 51-53.
- 131- Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., SánchezAlcaraz, 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(7):1210-1248.
- 132- 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):258-264.
- 133- Roth, J. A., Kaeberle, M. L. & Griffith, R. W. (1981). *American Journal of Veterinary Research* 42, 244
- 134- Rouse, B. T., & Horohov, D. W. (1986). Immunosuppression in Viral Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 8(6), 850–873. doi:10.1093/clinids/8.6.850
- 135- Saizar, J, Gil A. (1998). Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en rodeos de carne del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Uruguay, p 10.
- 136- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R. (2010). Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57: 205-220.

- 137- Sienna R, Guarino H. (1991). Prevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras de leche mezcla de tambos de Canelones, Colonia y San José, II Jor.Téc.Fac.Vet. p.41
- 138- Sienna, R., Guarino, H., Gil, A. (2000). Influencia de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica sobre la Reproducción y Producción de Rodeos Lecheros. INIA. Avances de Investigación en Sanidad Animal. Serie FPTA-INIA. 1:21-38.
- 139- Sledge, D., Maes, R., Wise, A., Kiupel, M. y Fitzgerald, S. (2009). Coinfection of a Cow with Bovine Leukemia Virus and Mycobacterium Bovis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 21(6), 878–882.
- 140- Stringfellow DA, Givens MD. (2000). Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. Anim. Reprod. Sci. 60-61:629-642.
- 141- Tizard, I. (2000). Introducción a la Inmunología Veterinaria. Barcelona, Elsevier 574 p.
- 142- Trainin, Z., Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. Israel J. Vet. Med. 60:94-105.
- 143- Trueblood, E.S., Brown, W.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Stone, D.M., McElwain, T.F. (1998). B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. J. Virol. 72:3169-3177.
- 144- Van Der Maaten M., Miller J., Schmerr M. (1981). Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. Am. J. Vet. Res. 42:1498-1500.
- 145- 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-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies

- paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 94:54-64.
- 146- Vanroose G, De Kruif A, Van Soom A. (2000). Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:131-143.
- 147- Verdonck, K., Gonzalez, E., Henostroza, G. y col. (2007). HTLV-1 infection is frequent among out-patients with pulmonary tuberculosis in northern Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:1066–1072.
- 148- Von Gehlen A. (2015). Descripción de datos de ganado lechero enviado a faena sanitaria por Tuberculosis Bovina en el 2013 en Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 42 p.
- 149- Vordermeier H. M., Whelan A. O., Hewinson R.G. (2008). The scientific case for the gamma-interferon Bovigam assay. *Gov Vet J*, 19: 38–43.
- 150- Wentink, G.H, Oirschot, J.T., Pelgrim, W., Wensing, T., Gruys, W. (1993). Experimental transmission of Bovine Leukosis virus by rectal palpation. *Vet. Rec.* 132(6):135-136.
- 151- Whipple, D. L., C. A. Bolin and J. M. Miller, 1996: Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8, 351-354.
- 152- Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., Trainin, Z. (1998). Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 207-218.
- 153- Zaffaroni, R., Piaggio, J., Nuñez, A., de Freitas, J., Suanes, A., Cernicchiaro, N., Gil, A. (2007). Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica en

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