



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE LA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE VACUNAS COMERCIALES PARA LA PREVENCIÓN DE LA
QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA**

Por

**Magdalena NIN ALONSO
Milagros ORTIZ DE TARANCO PITTAMEGLIO**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Pablo Alonzo

Segundo miembro:



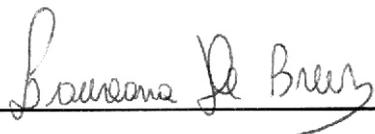
Rodrigo Puentes

Tercer miembro:



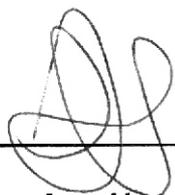
Martín Breijo

Cuarto miembro:



Laureana De Brun

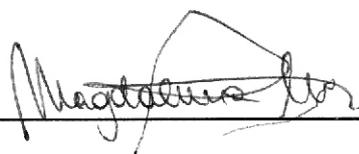
Quinto miembro:



Ana Umpierrez

Fecha: 20/12/22

Autores:



Magdalena Nin Alonso



Milagros Ortiz de Taranco Pittameglio

2. AGRADECIMIENTOS

A nuestras Familias, por ser nuestro sostén y ejemplo a seguir, incentivándonos a crecer todos los días.

A nuestros amigos que nos han apoyado y acompañado durante toda la carrera.

A nuestros tutores y cotutores, por su dedicación y guía en este trabajo. A la Facultad de Veterinaria y al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por hacer posible que esta tesis se llevara a cabo.

A Don Carlos S.A., por su generosidad y disposición, al brindar su establecimiento y animales para la realización del estudio. A Carlos Ortiz de Taranco, Veterinario encargado que nos vinculó con el predio, nos acompañó y asesoró en todo el proceso. Y al personal por la ayuda y buena voluntad en los trabajos de campo.

A todos los profesionales de distintas áreas que desde su lugar nos brindaron su ayuda, experiencia, conocimientos y materiales.

TABLA DE CONTENIDO

Página

1. PÁGINA DE APROBACIÓN	2
2. AGRADECIMIENTOS	3
3. RESUMEN	6
4. SUMMARY	7
5. INTRODUCCIÓN	8
6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
6. I. Etiología	10
6. II. Impacto económico en Uruguay	12
6. III. Epidemiología	13
6. IV. Patogenia y signos clínicos	14
6. V. Respuesta inmune	16
6. VI. Profilaxis y prevención	18
6. VII. Diagnóstico	21
6. VIII. Tratamiento de la QIB – uso de antibióticos	22
7. HIPOTESIS	24
8. OBJETIVOS	24
9. MATERIALES Y MÉTODOS	25
10. RESULTADOS	27
10. I. Observación de campo	27
10. II. Análisis de datos de signos clínicos.....	29
10. III. Diagnostico bacteriológico	30
10. IV. Asociación de la pigmentación ocular con la presencia de signos clínicos	31
10. V. Determinación de la respuesta inmune humoral.....	31
11. DISCUSIÓN	36
12. CONCLUSIONES	41
13. BIBLIOGRAFÍA	42

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Escore Clínico para realización del diagnóstico de Queratoconjuntivitis infecciosa bovina	16
Tabla 2. Características de <i>Moraxella bovis</i> y <i>M. bovoculi</i>	22

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Animal con signos clínicos compatibles a un grado 1 de Queratoconjuntivitis infecciosa bovina al tiempo 180 del ensayo	27
Figura 2. Animal con signos clínicos compatibles con un grado 2 de Queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Queratitis, opacidad corneal y dilatación de vasos episclerales. Tiempo 180 del ensayo	27
Figura 3. Animal con signos clínicos compatibles a un grado 3 de Queratoconjuntivitis infecciosa bovina, con presencia de úlcera corneal. Tiempo 180 del ensayo	28
Figura 4. Animal con signos clínicos compatibles con un grado 4 de Queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Tiempo 180 del ensayo	28
Figura 5. Distribución de grados clínicos de enfermedad según cada grupo, en los distintos tiempos del ensayo	29
Figura 6. Crecimiento de colonias bacterianas de <i>Moraxella spp.</i> en agar sangre ovina al 4%	30
Figura 7. Distribución de animales enfermos y sanos según su grado de pigmentación	31
Figura 8. Modelo lineal generalizado (LM, distribución Gamma, logit). Absorbancia medida a 415 nm en los diferentes grupos en el tiempo.....	32
Figura 9. Respuesta de IgG séricos anti proteínas totales de <i>M. bovis</i> Epp 63 (Absorbancia 415 nm) para cada grupo estudiado en el tiempo	33
Figura 10. Nivel de anticuerpos IgG anti proteínas totales de <i>M. bovis</i> Epp 63 (Absorbancia 415 nm) y grados clínicos de la enfermedad según vacunas	35

3. RESUMEN

La Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB), también llamada Ojo rosado o *Pink eye*, es principalmente producida por la bacteria *Moraxella bovis*. Si bien no es una enfermedad mortal, tiene un gran impacto económico y productivo en los rodeos que la padecen, y a nivel nacional las medidas de control aún no han logrado resultados positivos constantes. Las pérdidas económicas están vinculadas a la disminución de la visión, de peso y de la producción de leche de los animales afectados, a gastos en tratamiento y mano de obra y descuentos por lesiones en frigorífico. En cuanto a la profilaxis, existen diversas vacunas disponibles para la prevención de la enfermedad y se aplican extensamente en nuestro país. Las mismas son formuladas en su mayoría con cepas de referencia inactivadas, las que pueden diferir antigénicamente de las cepas de campo circulantes en un país o región. Paralelamente, evidencias científicas previas han demostrado que algunas vacunas para prevenir la QIB son ineficaces, manteniendo el mismo nivel de riesgo de infección, entre animales vacunados y no vacunados y sin diferencias significativas en la ganancia de peso de los grupos evaluados. En esta tesis se seleccionaron 3 vacunas comerciales utilizadas para la prevención de QIB en nuestro país, con el objetivo de evaluar clínica e inmunológicamente su eficacia a nivel de campo. Se trabajó con 4 grupos de terneros de raza carnífera (n=20) 3 grupos inmunizados y un grupo control. Las vacunaciones se realizaron en relación a las recomendaciones del fabricante de cada vacuna. Se tomaron muestras de sangre periódicas durante 180 días, así como también la revisión clínica de los animales. Posteriormente, una vez obtenidos los sueros, se determinó mediante ELISA indirecto el título de anticuerpos de los diferentes grupos de animales inmunizados por vía sistémica y del grupo control. La variabilidad obtenida en las distintas curvas de niveles de anticuerpos, registro de signos clínicos y grados de enfermedad, aún generan dudas sobre la eficacia de las vacunas, el grado y calidad de la inmunidad y protección frente a la enfermedad, así como también de la composición de las vacunas y su vía de administración. Los resultados obtenidos en esta tesis podrían indicar que las vacunas con un mayor título de anticuerpos no están asociadas a una menor presentación de la enfermedad clínica en el rodeo, sino que probablemente la utilidad de las mismas se reduce a la disminución en la severidad de las lesiones y la duración de la enfermedad clínica.

4. SUMMARY

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK), also known as pinkeye, is mainly produced by the organism *M. bovis*. Although it is not a fatal disease, it has a great economic and productive impact on herds that suffer from it, and in our country control measures have not yet achieved constant positive results. The economic losses are associated with the decreased vision, weight and milk production in affected animals, as well as treatment expenses, labor and discounts in meat processing plants. As to disease prophylaxis, various vaccines are available for prevention and are widely applied in our country. These are mainly formulated from inactivated reference strains, which can antigenically differ from the ones circulating in a country or geographic region. Scientific evidence has demonstrated that some vaccines used for IKB prevention are ineffective, showing the same risk of infection between vaccinated and not vaccinated animals, without significant differences in weight between groups. In this thesis we selected three different vaccines which are used in Uruguay to prevent IKB. The aim was to clinically and immunologically evaluate their effectiveness at a field level. The animals used for the experiment were meat breed calves, divided in four groups (n=20), three immunized and a control group. The vaccinations were done regarding the laboratory's recommendations for each vaccine. This procedure was performed simultaneously with periodic bleedings over 180 days, in addition to the animals clinical observation and records. Subsequently, once the serums were obtained, the titer of antibodies of the different groups was determined by indirect ELISA. Among the thesis's objectives, we looked forward to determining the presence of clinical symptoms according to the disease and evaluating the relationship between the antibodies titer and the disease's natural appearance. Doubts remain about the efficacy of vaccines, degree and quality of immunity and protection against disease, vaccine composition and route of administration, due to the variability obtained in the different antibody level curves, records of clinical signs and degrees of disease. The results of this thesis could indicate that the vaccines which reached a higher level of antibodies are not associated with a lower presentation of clinical disease in the herd, but their usefulness is probably reduced to the decrease in the severity of the lesions and the duration of the clinical disease.

5. INTRODUCCIÓN

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una enfermedad infectocontagiosa que afecta al ganado bovino y provoca importantes pérdidas económicas tanto a nivel mundial como en nuestro país (Sosa, 2013). La misma se da más frecuentemente en animales jóvenes durante su primer verano, asociada a factores predisponentes de tipo genético, ambiental, físico, entre otros. Es la enfermedad ocular más común en el ganado bovino, pudiendo afectar a todas las razas, aunque en general afecta mayormente a las de pelaje claro (Frisch, 1975; Ward y Neilson, 1979).

Es causada por *Moraxella bovis*, una bacteria Gram negativa que desarrolla su patogenicidad mediante la expresión de fimbrias que se adhieren a la superficie corneal y citotoxinas que destruyen las células epiteliales de la misma (Rogers, Cheville y Pugh, 1987). También se ha visto una asociación de *Moraxella bovoculi*, con la presencia de QIB clínica. (Angelos, Spinks, Ball y George, 2007). Sin embargo, la causalidad directa de esta última con QIB no es clara, permaneciendo en investigación (Gould et al., 2013).

La patogénesis de esta enfermedad es influenciada por muchos factores, como son la estación del año, la irritación mecánica, la pigmentación ocular y el sistema inmune del huésped, el medio ambiente, los patógenos concurrentes y la cepa bacteriana involucrada (Snowder, Van Vleck, Cundiff y Bennet, 2005). Entre los factores extrínsecos que colaboran en el desarrollo de la QIB se mencionan la exposición de los animales a la radiación ultravioleta, la presencia de la mosca de la cara, infecciones concurrentes con *Mycoplasma* spp o virus de IBR, el polvo y las plantas que generen traumatismos (Arends, Wright, Barto y Lusby, 1984; Lepper y Barton 1987; Pugh, Hughes y Packer, 1970; Pugh, Hughes y Schulz, 1976; Pugh, McDonald y Kopencky, 1980; Rosenbusch, 1983).

La compleja interacción entre el huésped, el medio ambiente y el agente etiológico, así como la dificultad que existe en la prevención y tratamiento de la enfermedad, justifican el estudio en profundidad de la misma. *M. bovis* es ubicua en la mayoría de las poblaciones bovinas y las estrategias para eliminar el patógeno no han sido identificadas, por lo que el control de la enfermedad se enfoca en estrategias de tipo preventivo (Brown, Brightman, Fenwick y Rider, 1998). La vacunación contra *M. bovis* en general no es exitosa y los resultados de los tratamientos con antibióticos incluyendo distintas vías de administración varían de acuerdo a la severidad de la QIB (Brown et al., 1998). A su vez, se ha registrado un aumento marcado en las infecciones causadas por bacterias multiresistentes, reflejo de la resistencia antimicrobiana (RAM) existente (Saleem, Ahmed, Mir, Ali y Zaidi, 2010). Esto resalta la necesidad de un uso prudente y adecuado de los antimicrobianos, sumado a que

se han incorporado escasos antimicrobianos nuevos al arsenal disponible, especialmente para Gram negativos (Camou, Zunino y Hortal, 2017).

Los esfuerzos por generar una vacuna eficaz se han enfocado en el uso de pilis superficiales y citolisina para estimular la respuesta inmune del huésped, pero es importante considerar que *M. bovis* contiene una gran variabilidad de factores de virulencia. El nivel de protección que ofrecen las vacunas depende de la relación entre los componentes de la misma y los serogrupos presentes en la región, lo que sugiere la necesidad de realizar una vigilancia epidemiológica regularmente mediante aislamientos y tipificación en los distintos brotes de la enfermedad. A su vez, la inmunidad protectora contra *M. bovis* es influenciada tanto por anticuerpos séricos como lagrimales, por lo que el desarrollo de una respuesta inmune eficaz también depende de la adecuada presentación antigénica (McConnel y House, 2005).

La diversidad antigénica y la capacidad de mutación que tiene la bacteria, dificultan el desarrollo de vacunas eficaces que generen buenos resultados a nivel nacional en la prevención de la enfermedad. Considerando esto, y la importancia que tiene la QIB en nuestro país, principalmente en cuanto a las pérdidas económicas que genera a nivel de la ganadería, este trabajo busca evaluar la inmunidad humoral generada por distintas vacunas comerciales utilizadas por productores en Uruguay contra la QIB, y su relación con la sintomatología clínica presente en los animales infectados.

6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

6.1 Etiología

En el correr de los años, se ha estudiado la etiología de QIB determinándose como agente causal y especie bacteriana más comúnmente vinculada a la enfermedad, a *M.bovis*. Dicha bacteria pertenece al género *Moraxella*, uno de los más grandes dentro de la familia *Moraxellaceae*, con aproximadamente 22 especies reconocidas, las cuales se consideran comensales, pero en ocasiones también parásitos de las membranas mucosas en mamíferos. *Moraxella* spp. es muy abundante tanto en la microbiota respiratoria como ocular y dentro de este género se destacan las especies *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* y *Moraxella ovis* (Cullen et al., 2017; Nicola et al., 2017; Parte, Sardá, Meier, Reimer y Joker, 2020; Rossau, Van Landschoot, Gillis y De Ley, 1991).

Las bacterias Gram negativas, por definición poseen una membrana externa la cual está compuesta de lipopolisacáridos, fosfolípidos, y proteínas de membrana externa (PME), dentro de las cuales las porinas tienen un papel importante en la adhesión e interacción huésped-patógeno. De hecho, a menudo se consideran esenciales para el desarrollo de la infección y posterior enfermedad, por lo que podrían tenerse en cuenta a la hora de formular una vacuna (Maiti, Shetty, Shekar, Karunasagar y Karunasagar, 2012).

M. bovis es un cocobacilo inmóvil, perteneciente al grupo de las bacterias Gram negativas, y desde el punto de vista bioquímico se caracteriza por ser oxidasa y catalasa positivo. Posee distintos factores de virulencia como toxinas, enzimas, fimbrias, entre otros, que le permiten adherirse, colonizar y dañar células, generando la sintomatología clínica. Existen distintas cepas de *Moraxella*, diferenciadas por las combinaciones de dichos factores de virulencia.

Las fimbrias son fibras proteicas imprescindibles para la unión con el epitelio corneal, y en el caso de *M. bovis*, se destacan las fimbrias de tipo IV. Éstas cumplen un rol clave para el desarrollo de la enfermedad, ya que cepas que no presentan fimbrias, no pueden adherirse al epitelio y por tanto, no logran desarrollar la posterior patogenicidad (Gil-Turnes, 1983; Jayappa y Lehr, 1986; Moore y Rutter, 1989). Se describen dos tipos de fimbria; la tipo Q que actúa en primer lugar en la adhesión y colonización bacteriana en la córnea bovina, y por otro lado la tipo I, la cual actúa en el mantenimiento de la infección (Ruehl et al., 1993).

En cuanto a la producción de enzimas y toxinas, *M. bovis* produce una gran cantidad de enzimas que participan de la patogenicidad de la enfermedad. A su vez, se ha identificado una exotoxina perteneciente a la familia RTX de exoproteínas

bacterianas, una beta hemolisina. Esta exotoxina es la responsable de la beta hemólisis observable en los cultivos de *M. bovis* sobre agar sangre; y en el ojo del bovino actúa alterando la membrana citoplasmática de las células, promoviendo el desarrollo de úlceras corneales (Angelos et al., 2001; Postma et al., 2008).

Si bien la QIB es protagonizada por *M. bovis*, cuando se obtienen muestras para realizar cultivos, no es raro encontrar otros agentes que pueden coexistir y exacerbar el cuadro clínico. Dentro de estos agentes es frecuente encontrar *M. bovoculi*, Herpesvirus tipo 1, *Mycoplasma bovis* y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Loy, Clothier y Maier, 2021).

- *M. bovoculi*: Dentro del género *Moraxella*, esta bacteria se considera homóloga a *M. bovis* en varios aspectos. A pesar de la estrecha similitud, no se ha podido replicar experimentalmente QIB a raíz de *M. bovoculi* (Angelos, Ball y Hess, 2007; Ely et al., 2019).
- *M. bovis*: actúa desde dos puntos de vista, por una parte es considerado como un agente inmunosupresor, por lo que podría predisponer al huésped a infecciones, y por otra parte se considera un agente causal de enfermedades como neumonía, mastitis, artritis y queratoconjuntivitis (Burki, Frey y Pilo, 2015). En un brote de QIB registrado en ganado de carne, donde se investigó *Mycoplasma* como agente causal, se identificó la misma en 33 aislamientos (Alberti et al., 2006).
- Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1): los herpesvirus, virus de la familia *herpesviridae*, se caracterizan por ser inmunosupresores, de hecho, se demostró que aquellos animales que fueron expuestos a BoHV-1, tuvieron una mayor incidencia de QIB, en comparación con animales que no habían sido enfrentados al herpesvirus previamente (Pugh, Hughes y Packer, 1970). Por otra parte, BoHV-1 es agente causal de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), en la cual se describen síntomas como conjuntivitis uni o bilateral, inflamación y enrojecimiento de la conjuntiva, secreción serosa y queratitis, similares a QIB.
- *L. monocytogenes*: esta bacteria se encuentra descrita, entre otros cuadros clínicos, como causante de infecciones con manifestaciones oculares semejantes a QIB, lo que se denomina como “*silage eye*”, ojo de ensilaje (Erdogan, 2010; Kummeneje y Mikkelsen, 1975). Experimentalmente, la bacteria puede penetrar directamente las células de la córnea. El alimento puede actuar como ruta de entrada; escenario que podría generarse en animales confinados para engorde (Rácz, Tenner y Szivessy, 1970; Stams, 1967).

6.2 Impacto económico en Uruguay

La QIB es una enfermedad muy relevante en nuestro país debido a las grandes pérdidas productivas y económicas que ocasiona, principalmente en los establecimientos ganaderos. Al afectar mayormente a animales jóvenes, disminuye significativamente su tasa de crecimiento (Thrift y Overfield, 1974; Ward y Nielson, 1979). Además, el estrés debido al malestar físico genera una reducción en el tiempo de alimentación y a una menor producción de leche. La disminución en el crecimiento de los terneros puede llegar a ser del 20% de su peso (Angelos, 2010; Funk et al., 2009). Todo esto se traduce en un menor rendimiento de los animales, lo que perjudica directamente al productor que padece el problema y a la producción ganadera nacional. A su vez, se deben considerar las pérdidas por gastos en tratamiento, manejo de los animales, mano de obra del personal, honorarios veterinarios y análisis de laboratorio (Hughes, 1981).

El impacto económico generado a causa de esta enfermedad en Uruguay mantiene a muchos productores en busca de alternativas que sean eficaces en disminuir la incidencia de la misma. Sin embargo, las características propias del agente causal, *Moraxella* spp., aún siguen en estudio y los datos sobre las diferentes cepas circulantes son escasos. Resultados de una tesis de maestría en el año 2013 indicaron por primera vez la existencia de dos especies distintas de *Moraxella* spp. asociadas a brotes clínicos en nuestro país; *M. bovis* y *M. bovoculi*, demostrando que *M. bovoculi* podría ser un importante agente de QIB en la ganadería del Uruguay. Las cepas de esta última, fueron encontradas en varios departamentos, incluyendo Artigas, Salto, Soriano, Cerro Largo, Treinta y Tres, Flores, San José, Tacuarembó y Canelones. A su vez, en el mismo trabajo, se confirmó la notoria diferencia fenotípica y genotípica entre las dos especies (Sosa, 2013).

A nivel mundial, existe una amplia distribución de la enfermedad y una gran variabilidad en los factores de virulencia en las distintas especies y cepas. La diversidad antigénica y capacidad de conversión de epítomos del agente causal, requiere una vigilancia epidemiológica continua a partir de aislamientos de brotes (McConnel y House, 2005). Esta variabilidad fenotípica es uno de los factores que probablemente pueda estar asociado a la ineficiencia en la prevención mediante vacunas comerciales, ya que las mismas en general son fabricadas a partir de cepas de referencia inactivadas y actualmente, la prevención y tratamiento de la QIB no demuestran resultados exitosos constantes en nuestro país ni a nivel internacional.

Para lograr buenos resultados en la prevención y tratamiento de la QIB, y disminuir el impacto negativo de esta problemática en nuestros sistemas, es necesario seguir definiendo la variabilidad genómica de los factores de virulencia presentes en las especies de *Moraxella*, así como su distribución en nuestro país. Es muy importante

la evaluación de las cepas locales para el desarrollo de vacunas efectivas (Umpierrez et al., 2015) y la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas actualmente utilizadas, con el objetivo de brindar a la producción ganadera uruguaya herramientas de prevención con buenos resultados.

6.3 Epidemiología

La incidencia de la enfermedad clínica de QIB y su gravedad, es un claro ejemplo de la función integrada que desempeñan los distintos componentes de la denominada tríada epidemiológica: medio ambiente, huésped y agente etiológico. Como se mencionó, la QIB es una enfermedad altamente contagiosa de rápida propagación dentro de un rebaño, pero la prevalencia tanto a nivel estacional como anual, difiere según las distintas regiones del mundo, incluso dentro de un país (Aikman, Allan y Selman, 1985). La mayor prevalencia y la forma de aparición más común de la enfermedad ocurre gradualmente durante la primavera, verano e incluso en el otoño sobre bovinos menores de dos años. No obstante, se han registrado casos clínicos en meses de invierno, e inclusive en ganado de mayor edad al que se le atribuye una mejor inmunidad. Hoy día existen distintas medidas profilácticas para el control de la enfermedad, dentro de las cuales la vacunación es muy utilizada y hay varias opciones disponibles en nuestro país, sin embargo los resultados obtenidos en los rodeos son cuestionables, lo que la hace una enfermedad epidemiológicamente relevante.

La prevalencia y severidad de lesiones es mayor en razas europeas (*Bos Taurus*) que cebuinas (*Bos indicus*), siendo estas últimas y sus cruzas más resistentes a QIB (Blood y Radostits, 1992; Turquieto, Chayer, Jorge y Passucci, 2008). Con respecto al sexo, existe una mayor tendencia de aparición en los machos que en las hembras, aunque no se ha determinado definitivamente (Powe, Nussbaum, Hoover, Rossmann y Smith, 1992). Un aspecto genético vinculado al huésped y que ha demostrado tener cierta influencia en la aparición de QIB, es la pigmentación ocular. La correlación genética entre la incidencia de la enfermedad, y el grado de pigmentación ocular no ha sido completamente dilucidada (Ward y Nielson, 1979). Sin embargo, ejemplares de la raza Hereford con pigmentación ocular presentan mayor incidencia de QIB que ejemplares de menor pigmentación y cruzas Hereford (Frisch, 1975; Ward y Nielson, 1979). Si bien la estimación de la heredabilidad de la pigmentación ocular en ganado Hereford es relativamente alta ($0,44 \pm 0,13$, Anderson et al., 1957; $0,55 \pm 0,33$, Vogt et al., 1963); la correlación fenotípica entre pigmentación y enfermedad clínica de QIB es baja (Ward y Nielson 1979). Esto implica que la selección animal a través del carácter pigmentación ocular puede tener éxito limitado en la disminución de la incidencia.

Además de la época del año, dentro de los factores medioambientales se mencionan el polvo, la exposición a radiación ultravioleta, tipo y calidad de pasturas, siendo aquellas encañadas, secas y altas posibles agresores para los ojos, y por lo

tanto predisponentes para la enfermedad. (Loy, Hille, Maier y Clawson, 2021). Dentro del medio ambiente cabe destacar la presencia de la mosca de la cara (*Musca autumnalis*) y mosca del establo (*Stomoxys Calcitrans*), las cuales además de ser un factor estresante para el animal, y con capacidad de irritar físicamente los ojos, se comportan como vectores mecánicos que participan en la transmisión activa de los agentes causantes de la enfermedad (Gerhardt, Allen, Grene y Smith, 1982).

En lo que respecta al agente etiológico, en la bibliografía se mencionan diferentes patógenos causales, pero la presencia de la bacteria *M. bovis* determina y confirma el diagnóstico de QIB. De hecho es capaz de producir experimentalmente la enfermedad en ausencia de otros patógenos.

6. 4 Patogenia y signos clínicos

La patogenia de *M. bovis* está ampliamente estudiada. Las fimbrias facilitan la adhesión al epitelio corneal. Son factores de virulencia necesarios para la colonización, por lo que su ausencia es indicativa de cepas no patógenas (Giltner, Nguyen y Burrows, 2012; Gil-Turnes, 1983; Moore y Rutter 1989). La bacteria invade y provoca lesiones en la córnea mediante una endotoxina dermonecrótica, pero sin alcanzar el torrente sanguíneo de los animales afectados. (Blood, Henderson y Radostis, 1988). A su vez, las cepas de *M. bovis* producen enzimas hidrolíticas que actúan descomponiendo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y moléculas de grasa de los huéspedes en unidades más pequeñas y de esta manera causan daño en los tejidos oculares. Entre ellas se incluyen esterases, lipasas, fosfoamidases, fosfatasas e hialuronidasas (Frank y Gerber, 1981). Otras cepas pueden contener plásmidos que codifican proteínas filamentosas similares a la hemaglutinina, las cuales colaboran en la colonización del huésped (Kakuda, Sarataphan, Tanaka y Takai, 2006).

La adquisición de hierro es también un micronutriente que permite que los patógenos se repliquen y mantengan la infección. Algunas cepas de *M. bovis* contienen proteínas de membrana externa vinculadas a la captación de hierro y son capaces de adquirirlo de la lactoferrina y transferrina bovina (Yu y Schryvers 2002).

En general, la QIB afecta únicamente al ojo, y la falta de compromiso sistémico es un factor que nos ayuda a diferenciar a esta enfermedad de otras que también presentan signos clínicos a nivel ocular. Por ejemplo, la incidencia de la conjuntivitis es considerable en enfermedades como neumonías virales, Lengua azul, Peste bovina, Diarrea viral bovina, Besnoitiosis, Fiebre Catarral Maligna e IBR, pero en éstas se presenta como un signo secundario y asociado a signos sistémicos (Kopecky, Pugh y McDonald, 1986).

Dentro de las estructuras oculares, la QIB afecta principalmente a la córnea, provocando en estadios tempranos, síntomas como lagrimeo, epífora,

blefaroespasmo, fotofobia y conjuntivitis en grados variables, aunque no siempre se encuentra esta última. La enfermedad puede progresar y generar edema corneal y ulceración de profundidad y diámetro variados, y el blefaroespasmo y lagrimeo a menudo aumentan con el progreso de la lesión ocular. Frecuentemente, los casos de QIB se resuelven espontáneamente luego de esta etapa. Sin embargo, el daño en la córnea puede llevar a ulceraciones muy profundas y al prolapso de la cámara anterior del ojo. En algunos casos, se ha encontrado una presión intraocular elevada, probablemente causada por el daño inflamatorio en el ángulo iridocorneal, el cual genera una alteración en el flujo de humor acuoso (Alexander, 2010).

Las lesiones tempranas pueden ser muy pequeñas y difícilmente visibles, y la evidencia de opacidad corneal (edema) generalmente no se aprecia a la distancia (Angelos, 2015). La mayoría de las úlceras corneales asociadas a QIB revierten terminando en cicatrices de distintos grados, que pueden llegar a perjudicar la visión de los animales (Angelos, 2015). A su vez, el dolor asociado al daño ocular, conjuntamente con la disminución en la visión, lleva inevitablemente a un menor consumo de alimento por parte de los animales y en consecuencia, a la disminución en su crecimiento y ganancia de peso. (Funk, Reecy, Wang y Tait, 2014; Snowden, Van Vleck, Cundiff y Bennett, 2005; Thrift y Overfield, 1974). En casos más severos, las lesiones pueden llevar a una ruptura corneal y posterior pérdida de la visión permanente (Angelos, 2015).

En resumen, la queratitis asociada a la QIB, la cual es definida como circunscripta y generalmente localizada en la zona central del ojo, y la ulceración corneal, son los signos clínicos más indicativos de QIB. Sin embargo, los mismos no son patognomónicos, por lo que siempre debemos descartar otras causas de lesiones oculares (Kneipp, 2021). Cualquier traumatismo, tanto físico como químico, puede provocar lesiones similares a las presentes en un animal con QIB, por lo que siempre debemos tenerlos en cuenta en el diagnóstico diferencial (Alexander, 2010). La descarga ocular de QIB es de carácter acuoso en sus comienzos, pero puede tornarse mucosa hasta purulenta con la complicación del cuadro (Alvarez, 2020). En algunos casos, el lagrimeo puede ser normal, y la presencia de mosca provoca grados variables de lagrimeo entre razas e individuos (Shugart et al., 1979).

Tabla 1: Score clínico para realización del diagnóstico de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) (Cardozo, 2007 citado por Martirena y Turrens, 2013)

Score	Lesiones	Pronóstico funcional
1	Conjuntivitis o conjuntivitis más leve queratitis (edema de córnea)	Reversible
2	Queratitis ulcerativa, queratitis abscedativa, descemetocele (acompañados de uveítis)	Reversible
3	Sinequias de 360°, úlceras perforadas, prolapso de iris en úlceras perforadas (estafilomas), panofalmitis, luxación de cristalino, ptisis bulbis, simblefarones. Miasis	Irreversible
4	Curación	

Estudios del comportamiento clínico de QIB en un establecimiento con antecedentes históricos de la enfermedad en nuestro país, pero sin antecedentes de vacunación, indicaron que un 57,4% de los animales previamente inmunizados permanecieron sin sintomatología, mientras que un 42,6% presentaron alteraciones oftalmológicas uni o bilaterales (n=75, Raza Polled Hereford, 10-14 meses de edad). Las lesiones oculares diagnosticadas en este estudio correspondían al Escore 1 y 2, mientras que no se encontraron lesiones pertenecientes al Score 3 (irreversibles) (Etchevarne y Fernandez, 2016) (Tabla 1).

6. 5 Respuesta inmune

Cuando los microorganismos logran vencer los distintos niveles de defensa de los organismos vivos y producir un cuadro de enfermedad, los denominamos patógenos. Evaden las defensas del organismo, tanto internas como externas y generan daño de distinta forma de acuerdo al patógeno actuante, lo que se conoce como factores de virulencia (Tizard, 2009).

Los mecanismos de defensa contra agentes extraños como las bacterias, incluyen las barreras físicas, la inmunidad innata, y la inmunidad adquirida. Dentro de las barreras físicas tenemos la integridad de la piel con sus distintos componentes y funciones, y en los distintos sistemas tales como el respiratorio, digestivo, reproductivo existen sistemas de defensa local. En el caso del ojo tenemos el blefarospasmo y el lagrimeo. Frecuentemente los microorganismos superan las barreras físicas, enfrentándose en primer lugar a la inmunidad innata. La inmunidad innata consiste en mecanismos químicos y celulares, los cuales reconocen a los microorganismos por su composición química distinta, y logran destruirlos. Este sistema no presenta lo que se denomina "memoria" por lo que cada encuentro con el mismo agente o uno nuevo, responderá y actuará bajo la misma intensidad, y las

distintas estrategias para combatirlo durarán el mismo tiempo igual que la primera vez (Tizard, 2009). Los actores de este sistema de defensa innato son macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK, y su principal característica es un inicio de actividad rápida, de minutos a horas ante el antígeno. De todos modos, resultan insuficientes los mecanismos de defensa mencionados; y es por eso que existe la última línea de defensa que es la respuesta inmune adquirida, que a diferencia del anterior presenta memoria, e incluso cuanto más encuentros tenga con el patógeno, más efectiva será su respuesta y función defensiva. Se caracteriza por ser eficaz luego de varios días, pero una vez que establece el reconocimiento del agente, la memoria, y receptores específicos para el próximo encuentro, resulta sumamente eficaz, incluso un individuo puede volverse inmune. Debido a que existen patógenos intra y extracelulares, es que la respuesta inmune adaptativa responde de distinta manera (Tizard, 2009). En caso de ser un antígeno extracelular, se generará memoria hacia el mismo y también se producirán anticuerpos que lograrán eliminarlo. De esta manera podría resumirse que el antígeno es captado por distintas células tales como macrófagos y células dendríticas. Los linfocitos B y T se unirán al antígeno gracias a la presentación de receptores específicos en su superficie. Los linfocitos generarán la memoria, en este caso al ser una respuesta mediada por anticuerpos serán los linfocitos B (Tizard, 2009).

Debido a que las superficies mucocutáneas y cutáneas resultan ser un sitio importante de colonización de patógenos e incluso sitio de entrada para los mismos, el organismo ha desarrollado mecanismos protectores adquiridos. Las distintas superficies corporales cuentan con mecanismos inmunes tanto celulares como mediados por anticuerpos. En el caso de la superficie ocular, las lágrimas son gran parte de esta respuesta, ya que son ricas en inmunoglobulina A; un anticuerpo que, si bien no es bactericida, tiene la capacidad de disminuir e incluso anular enzimas víricas o bacterianas (Tizard, 2009). Las lágrimas también cuentan con lactoferrina, que es una proteína que colabora en la defensa con un efecto bacteriostático (Slatter, 2004).

Los animales tienen entonces dos vías de inmunización, una es la inmunización pasiva la cual es de rápida acción pero tiene una duración determinada, como es el ejemplo de la inmunidad transferida con anticuerpos calostrales. La inmunidad activa en cambio se genera a partir de la exposición del animal al patógeno o a través de vacunas con la administración del antígeno al animal. La inmunidad en este caso se genera más lentamente pero es más duradera (Tizard, 2009).

En cuanto a la queratoconjuntivitis, existen diversas vacunas comerciales. El éxito o fallo de ellas depende de factores como el procedimiento de elaboración, la cepa utilizada, el tipo de vacuna si está viva o inactivada, la vía de administración y su correcta realización, la respuesta individual animal, entre otras. Como se mencionó previamente, el principal agente causal de la QIB, *M. bovis*, presenta diversas cepas diferenciadas por los factores de virulencia que presentan; el cual es un aspecto

descrito dentro de las fallas vacunales y que podría explicar el fenómeno de respuesta variable ante las inmunizaciones contra QIB a nivel nacional. La variabilidad entre las cepas circulantes en los preparados vacunales podría ser la causa de respuestas insuficientes.

Se ha demostrado que los anticuerpos contra *M. bovis* en suero y también en lágrimas están presentes cuando ocurre la enfermedad severa (Nayar y Saunders, 1975). Aunque la resistencia a la infección por *M. bovis* puede estar dada por la inmunidad humoral sistémica de IgG (Kopecky, Pugh y McDonald, 1983 citado por McConnel y House, 2005). Se ha demostrado que estos anticuerpos pueden no proteger a los animales de una infección recurrente, pero sí ser responsables de una reducción en la longitud y severidad de los signos clínicos presentes. Por otro lado, los anticuerpos específicos IgA de secreciones lagrimales pueden llegar a ser un mejor indicador de la resistencia a la reinfección (Smith y Greene, 1989 citado por McConnel y House, 2005). Sin embargo, es probable que el desarrollo de la enfermedad clínica sea necesario para generar los mismos, mientras que una enfermedad leve puede no llegar a prevenir la reinfección (Nayar y Saunders, 1975).

6. 6 Profilaxis y prevención

Las grandes pérdidas económicas que son atribuidas a la QIB, justifican una continua investigación sobre la enfermedad, y especialmente acerca de los métodos de prevención de la misma. *M. bovis*, ha sido uno de los agentes etiológicos más estudiados respecto a la prevención de la QIB ya que tiene un gran potencial de diversidad antigénica, así como también de conversión de epítomos, lo que hace que esta enfermedad requiera de una vigilancia epidemiológica constante mediante aislamientos de brotes (McConnel y House, 2005).

Las principales estrategias para la prevención de QIB se basan en el control del vector más importante de la enfermedad, la mosca de la cara, y en la estimulación de la inmunidad del huésped mediante el uso de vacunas contra *M. bovis* (Brown, Brightman, Fenwick y Rider, 1998). El intento de desarrollar una vacuna eficaz, se ha enfocado primariamente en el uso de fimbrias de superficie o citolisinas para estimular la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, debido a que *M. bovis* es un microorganismo conocido por su diversidad en factores de virulencia, resulta necesario profundizar en la búsqueda de nuevos antígenos conservados que sean inmunogénicos y que su inclusión en los preparados conlleve a una protección contra la enfermedad, proporcionando alternativas para el desarrollo de vacunas para la prevención (McConnel y House, 2005).

Vacunas celulares

Se ha observado que animales vacunados sistémicamente con bacterinas de *M. bovis* pueden resistir la infección o enfermedad causada por cepas homólogas en

mayor medida que la producida por cepas heterólogas. Por otro lado, en un estudio donde bovinos se inmunizaron con vacunas en base a células rotas de *M. bovis*, no se observó resistencia a QIB y su suero careció de anticuerpos contra las fimbrias (Pugh y Hughes, 1976 citado por McConnel y House, 2005).

En cambio, en otro estudio donde los animales se inmunizaron con bacterinas preparadas a partir de cepas con fimbrias no hemolíticas (y por tanto avirulentas) sí desarrollaron resistencia contra cepas hemolíticas y virulentas de *M. bovis*, lo que sugiere que la respuesta inmune estaría fuertemente asociada a los antígenos de la fimbria (Pugh, McDonald y Kopecky, 1982 citado por McConnel y House, 2005).

Vacunas de subunidades

Las fimbrias en la superficie son los antígenos recomendados para la utilización tanto de vacunas con componentes celulares como aquellas producidas en base a componentes acelulares debido a su capacidad antigénica e inmunogénica. Sin embargo, se debe considerar la existencia de una gran variedad de serogrupos (McConnel y House, 2005).

Experimentos *in vitro* demostraron que la variación en la expresión de proteínas de *M. bovis*, le permite cambiar de un tipo de expresión de fimbria a otra (Ruehl et al., 1993; Ruehl, Marks, Fernandez, Falkow y Schoolnik, 1988).

Por otra parte, resultados de una prueba de campo con una vacuna comercial inactivada (bacterina) producida a partir de células enteras de *M. bovis* fimbriadas no mostraron resultados significativos en la incidencia de QIB, pero sí una reducción en la severidad de las lesiones y el número de tratamientos requeridos (Bateman, Leslie y Scholl, 1986). También se ha propuesto que la inducción de la inmunidad protectora con vacunas basadas en fimbrias sería serogrupo-específica (Lepper, Moore, Atwell y Tennet, 1992). A su vez, los brotes de QIB pueden contener aislamientos que pertenezcan a varios serogrupos, lo que podría limitar la eficacia de las autovacunas (Davidson y Stokka, 2003). Asimismo, la inclusión de fimbrias de todos los serogrupos podría resultar en problemas debido a la competencia antigénica (Lepper, Moore, Atwell y Tennet, 1992). También es importante considerar que cambios en las condiciones ambientales o características fisiológicas del huésped pueden generar la emergencia de nuevos tipos de fimbrias, serológicamente distintas a las endémicas o a las presentes en las vacunas (Greene, Grubbs y Potgieter, 2001).

Otras estrategias que se han explorado por ejemplo es el tratamiento de las fimbrias con bromuro de cianógeno, produciendo la escisión de sus polipéptidos, y generando como resultado fragmentos de fimbrias para utilizar como inmunógenos. En un estudio, se obtuvo antisuero de conejo contra fragmentos de fimbrias, y se observó que el mismo contenía anticuerpos capaces de reaccionar con antígenos conservados en las fimbrias intactas. Sin embargo, un antisuero contra fimbrias enteras pareció carecer o contener menos anticuerpos reactivos hacia los antígenos conservados. Los títulos de anticuerpos en este último caso son mucho menores hacia las fimbrias heterólogas en relación a los homólogos. Mientras que el suero

contra fragmentos de fimbrias contiene títulos de anticuerpos altos contra fimbrias heterólogas y homólogas por igual. Si estos inmunógenos generarán una respuesta inmune en el ganado se podrían desarrollar vacunas a partir de fimbrias tratadas con bromuro de cianógeno, induciendo una respuesta inmune mucho más amplia hacia QIB de la que se obtiene actualmente con vacunas basadas en fimbrias enteras (Greene, Grubbs y Potgieter, 2001).

Vacunas basadas en citolisinas

Otra de las aproximaciones es la utilización de citolisinas como antígenos vacunales. Se ha observado que animales con QIB desarrollan anticuerpos anti-hemolisina que son capaces de neutralizar la actividad de la citolisina de múltiples cepas de *M. bovis* (Billson et al., 1994) y que la vacunación de terneros mediante un ultrafiltrado de sobrenadantes de cultivos de *M. bovis* hemolítica protege contra el desafío con una cepa heteróloga de *M. bovis*, con una respuesta de anticuerpos anti-hemolíticos detectable sistémicamente pero no en lágrimas (Billson et al., 1994; George, Angelos y Ruehl, 2004). Por otro lado, anticuerpos monoclonales producidos a partir de sobrenadantes de *M. bovis* hemolítica, neutralizan el potencial hemolítico y citotóxico sobre los epitelios oculares, de cepas de *M. bovis* representando los siete serogrupos de fimbria (Billson et al., 2000).

Es esperable que la inmunización con una preparación capaz de neutralizar la actividad de la citolisina de *M. bovis* proteja contra la destrucción de neutrófilos y la liberación de enzimas proteolíticas por parte del huésped. En consecuencia, se reduciría el edema corneal y licuefacción del estroma y se vería potenciada la fagocitosis, llevando a una disminución en la colonización ocular, mayor cicatrización de la córnea y reducción de la duración de la enfermedad (Hoiendalen, Rosenbusch y Roth, 1990 citado por McConnel y House, 2005). Para considerarse un inmunógeno clínicamente útil, la citolisina debería iniciar una respuesta antitóxica que protegerá contra *M. bovis*.

Estudios sugirieron que la actividad antigénica y citolítica de la citolisina de *M. bovis* se conserva en los aislamientos y es estable hasta 4 meses cuando son refrigerados o congelados (George et al., 2004) y que terneros inmunizados con una vacuna enriquecida con citolisina generan un grado de resistencia contra la ocurrencia natural de QIB, sin evidencia de signos clínicos indicativos de endotoxemia o necrosis tisular. Algunos efectos benéficos que se pueden atribuir a vacunas elaboradas en base a citolisina incluyen una tasa más lenta de aparición de QIB, reducción de la presencia de enfermedad clínica a la primer observación y úlceras corneales de menor tamaño, así como también una disminución en el número de terneros afectados (George, Borrowman y Angelos, 2005).

Aunque la fimbria y la hemolisina son los factores de virulencia determinantes y sustancialmente asociados a la patogénesis de *M. bovis* (Billson et al., 1994; Gil-Turnes, 1983) estudios *in vitro* sugieren que *M. bovis* produce una amplia variedad de factores de virulencia que incluyen proteasas, fibrinolisininas y fosfolipasas (Farn, Strugnell, Hoyne, Michalski y Tennet, 2001; Frank y Gerber, 1981) los cuales,

conservados adecuadamente, podrían ser potenciales antígenos para el desarrollo de vacunas.

6. 7 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la enfermedad es escaso, ya que comúnmente se asume que los signos clínicos descritos corresponden a QIB, pero se olvida que las manifestaciones clínicas pueden ser un disfraz, ya que varias enfermedades oculares, y sistémicas con repercusión ocular, comparten dicha sintomatología. Se debe recordar que la mayoría de las enfermedades oculares no presentan signos clínicos patognomónicos y es por este motivo que a la hora de sospechar de QIB deben tenerse en cuenta otras evidencias epidemiológicas tales como antecedentes, signos clínicos, curso y duración de la enfermedad, condiciones ambientales y salud del rodeo, para englobar el diagnóstico desde distintos puntos de vista. Es importante tener en cuenta que la enfermedad se caracteriza por ser colectiva, que afecta solo los ojos, particularmente en animales jóvenes y en épocas cálidas (Kneipp, 2021). Los ojos lesionados se curan en 1 a 3 semanas, pero también pueden recuperarse en cualquier etapa (George, Wilson, Baggot y Mihalyi, 1984). Por otra parte, las úlceras de gravedad leve y sin infección, pueden curarse sin tratamiento en 4-7 días (Maggs, Miller y Hardcover, 2018). En cuanto al diagnóstico por laboratorio, lo más utilizado es el cultivo de muestras obtenidas de hisopados oculares, pero la gran limitante, en el caso de *M. bovis* y *M. bovoculi*, es que este microorganismo pueden cultivarse a partir de animales y rodeos sanos, y que en los animales enfermos suele haber invasión secundaria o contaminación de muestras, que hacen a un cultivo dificultoso y confuso (Cullen, Engelken, Cooper y O'Connor, 2017; Lepper y Barton 1987; Zbrun, Zielinski, Piscitelli, Descarga y Urbani, 2011). Los cultivos de *M. bovis* se caracterizan por colonias tanto lisas como rugosas, de forma circular con un diámetro de 1 a 3 mm, y a su vez también presentan un halo de beta hemólisis de un tamaño de 0,5 a 1 mm. A continuación (Tabla 2) se mencionan las características fenotípicas más comunes de *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Tabla 2: Características de *M. bovis* y *M. bovoculi* (Adaptado de Tesis de Doctorado Sosa Torres, 2013).

Prueba	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>
Tinción de Gram	-	-
Tipo de respiración	Aerobia	Aerobia
Movilidad	-	-
Actividad catalasa	+	+
Actividad oxidasa	+	+
Reducción de nitrato	-	+
Fenilalanina desaminasa	-	+

La combinación de signos clínicos típicos, historia de incidencia de la enfermedad en un predio/rodeo, la rápida y alta propagación, son considerados elementos muy confiables para el diagnóstico, incluso más que los cultivos bacterianos, ya que estos mismos suelen estar contaminados de flora secundaria oportunista.

6. 8 Tratamiento de la QIB - uso de antibióticos

El tratamiento de los síntomas de QIB es un pequeño eslabón dentro del manejo integrado de la enfermedad. Por la complejidad epidemiológica, los veterinarios y productores se enfocan en la prevención y profilaxis para disminuir la incidencia clínica, pero una vez que ésta aparece, es recomendable establecer un tratamiento. Numerosos factores determinan la ejecución del tratamiento, tales como la eficacia antimicrobiana asociada a la resistencia, características de los fármacos a utilizar, costo de los mismos, categoría y cantidad de animales enfermos, posibilidad de acceso a atención veterinaria, e instalaciones. Por este motivo es que cada situación epidemiológica es única, y la mejor opción a realizar depende del análisis de los factores mencionados (Mcconnel, Shum y House, 2007).

Toda terapia antimicrobiana requiere de una concentración inhibitoria mínima (CIM), que en este caso debe alcanzarse en el ojo. Los fármacos a utilizar pueden ser de distintas formas de aplicación tales como sistémica, tópica o intrapalpebral (inyección subconjuntival). En caso de fracaso terapéutico resulta de utilidad realizar un test de resistencia antimicrobiana.

Tratamiento sistémico: a diferencia de otras formas de administración, en este caso, los fármacos alcanzan por último el sitio de acción, y lo hacen a través de las lágrimas (Mcconnel, Shum y House, 2007). Generalmente las drogas lipofílicas alcanzan mayores concentraciones en las lágrimas que aquellas hidrofílicas; ya que tienen la capacidad de atravesar distintas barreras celulares hasta alcanzar el sitio

de acción (George, 1990; Mishima, 1981; Ward y Clark, 1991). De todas formas, no todos los fármacos lipofílicos son eficaces contra *M. bovis*, por lo que altas concentraciones de fármaco en las lágrimas no siempre implican una terapia exitosa, como es el caso de la Trimetoprima y la Eritromicina (George, 1990). Por otro lado, se ha demostrado la eliminación de *M. bovis* en animales con QIB, tras la administración tanto de Oxitetraciclina LA como de Florfenicol (Smith y George, 1985). La efectividad de la Oxitetraciclina se atribuye a que alcanza únicamente concentraciones menores a 1 µg/ml en las lágrimas, mientras que en la conjuntiva alcanza niveles mayores a 2 µg/ml por aproximadamente 72 horas (George, Smith y Kaswan, 1985; Punch, Costa, Chambers, Slatter y Wilcox, 1985).

Tratamiento local tópico: este tipo de tratamiento se caracteriza y recomienda por ser económicamente favorable, y de fácil aplicación (George, 1990). Sin embargo, el tiempo de permanencia y acción en el ojo es corto ya que los animales no tardan mucho en eliminarlo en las lágrimas, tras el efecto irritativo en la aplicación. Tal es el caso de la Oxitetraciclina de aplicación tópica, tanto en aerosol como en polvo, que a pesar de ser potencialmente eficaz, requiere de 3-4 aplicaciones diarias, por un periodo de 4 a 7 días para obtener los resultados deseados (Ward y Clark, 1991). Aplicaciones más densas como ungüentos o formulaciones oleosas permanecen más tiempo en el sitio de acción, como es el caso de la Cloxacilina benzatínica oleosa, que con una o dos aplicaciones con un intervalo de 72 horas provee resultados exitosos (Daigneault y George, 1990). Un estudio que evaluó la Cloxacilina de aplicación local, demostró que para la eliminación de *M. bovis* de los tejidos oculares es necesario que exista y permanezca una concentración de la droga por encima de la CIM, en lugar de una concentración máxima en un corto periodo de tiempo (Daigneault y George, 1990).

Tratamientos subconjuntivales: consisten en la aplicación de antimicrobianos en estructuras oculares, específicamente la subconjuntiva palpebral superior o subconjuntiva bulbar. Al igual que los tratamientos tópicos, esta estrategia reduce los costos de tratamiento y dosis farmacéuticas totales al lograr altas concentraciones oculares del fármaco (George, 1990).

7. HIPOTESIS

Las distintas vacunas comerciales disponibles en Uruguay para la prevención de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina producen pobre inmunidad humoral sistémica y baja protección a campo.

8. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar clínica e inmunológicamente 3 vacunas comerciales contra la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina frente a la exposición natural a campo.

Objetivos Específicos

- Determinar la aparición de sintomatología clínica compatible con QIB en terneros inmunizados.
- Determinar mediante ELISA, el título de anticuerpos IgG contra proteínas totales de *M. bovis* Epp63, producidos por vacunas comerciales contra la enfermedad.
- Evaluar la correlación existente entre el título de anticuerpos y la aparición natural de QIB en los bovinos.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de animales y plan de inmunización

El protocolo experimental para la realización de esta tesis fue aprobado por la Comisión Experimental de Animales de Experimentación, con número de expediente 111900-000534-21 (CEUA 1333) – FVet.

Este ensayo fue realizado sobre terneros nacidos en otoño del año 2021, de las razas Hereford, Aberdeen Angus y otras cruas. Los animales se encontraban a campo natural al pie de la madre, en un establecimiento con antecedentes de la enfermedad, pero no habían sido inmunizados previamente. Se estableció entre 2 a 4 meses, como tiempo mínimo de espera luego del nacimiento, para evitar la interferencia de los anticuerpos maternos.

Se realizaron 4 grupos de 25 animales cada uno:

- Grupo 1 – Testigo sin vacunación (grupo control)
- Grupo 2 – Vacuna comercial “A” conteniendo *M. bovis* inactivada, serotipos C,D,E; *M. bovoculi* y *M. ovis*.
- Grupo 3 – Vacuna comercial “B” conteniendo un cultivo inactivado de *Moraxella* spp., cepas EPP63, FLA64, I, SAH38.
- Grupo 4 – Vacuna comercial “C” conteniendo una suspensión inactivada de Virus Herpes Bovino tipo 1 (BHV-1), Herpes Bovino tipo 5 (BHV-5), *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*.

La distribución de los animales a los distintos grupos fue realizada seleccionando un animal para cada grupo (del 1 al 4), de acuerdo al orden en que los animales entraban del huevo al tubo.

El protocolo de inmunización utilizado fue el recomendado por el fabricante, administrando la primera dosis a fines de junio del 2021 y la segunda dosis aproximadamente a los 30 días de administrada la primera.

Extracción y almacenamiento de las muestras

Se extrajeron muestras de sangre sin anticoagulante por la vena yugular de todos los animales del ensayo. Esto se realizó de manera seriada al comienzo del experimento día 0, día 30, 60, 90 y 180 consecutivamente. Para esto se utilizaron jeringas estériles con agujas 18G y tubos secos de vidrio. Las muestras fueron enviadas rápidamente al laboratorio donde se procedió a la extracción del suero mediante centrifugación a 2200 rpm durante 15 minutos, identificación y almacenamiento a -20°C hasta su procesamiento.

Seguimiento clínico de los animales

Se realizó un seguimiento clínico de todos los animales (grupos inmunizados y control) desde el día 0 (primovacunación) hasta los 180 días de iniciado el experimento. Se realizó un examen objetivo general y una exploración física de ambos ojos, registrando cualquier signo clínico compatible con la enfermedad e hisopados conjuntivales a los animales que se consideraron necesarios.

Determinación del título de anticuerpos totales y anti-PME-CD

Mediante ensayos de ELISA indirecto se determinó el título de anticuerpos en los sueros de los diferentes grupos de animales inmunizados por vía sistémica y del grupo control. Se tomó una muestra aleatoria de 10 sueros para cada grupo. Dicha

técnica se realizó en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), utilizando protocolos previamente desarrollados en el Departamento de Microbiología de dicha institución. Las placas de microtitulación de alta afinidad (Greiner®) se sensibilizaron con 30 µg/mL del antígeno (proteínas totales de la cepa de referencia *M. bovis* Epp63 resuspendida en buffer de sensibilización), y se incubaron hasta el día siguiente a 4°C en cámara húmeda. Luego, se lavaron los pocillos con PBS-Tween 20 al 0,1%. Una vez sensibilizadas, las placas se bloquearon con 200 µL de PBS-Tween 0,1%-Leche 1%(PBS-T-L) y se incubaron 90 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Las diluciones de los sueros (1/1 00) se realizaron en PBS-T-BSA y se utilizaron blancos como control negativo. Luego de colocar el suero de cada animal (100 µL) en los pocillos correspondientes, las placas se incubaron 30 minutos a 37 °C con agitación. Después de lavar las placas con PBS-Tween, se agregaron 100 µL del conjugado anti-IgG bovino acoplado a peroxidasa (KPL) (KPL), diluido 1/500 en PBS-T-L. La incubación del conjugado fue de 30 minutos a 37 °C. El revelado de las placas fue realizado agregando el sustrato de la enzima, Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate (Sigma), en buffer sustrato y se incubó 8 minutos a temperatura ambiente hasta que se observó el desarrollo de color. La reacción se detuvo agregando 50 µl/pocillo de NaOH 3N y se midió la absorbancia a 415 nm en lector de placas multimodo Varioskan (Thermo Scientific).

Cultivo bacteriano y pruebas bioquímicas primarias

Se realizaron cultivos bacterianos a partir de hisopados oculares obtenidos de animales sintomáticos en el predio estudiado. Los mismos fueron realizados sobre Agar sangre ovina al 4% que permitió observar la presencia de hemólisis, luego de una incubación durante 48 a 72 horas a 37°C en el laboratorio de Microbiología de Facultad de Veterinaria. A su vez, se realizaron pruebas bioquímicas primarias: Prueba de la catalasa, Prueba de la potasa y tinción de Gram.

Registro y análisis de datos

Se registraron los datos de cada grupo de animales mediante planillas de Microsoft Office Excel, especificando caravana, raza, vacuna administrada, grado de pigmentación ocular y manifestaciones clínicas, entre otros datos que se consideraron relevantes de cada animal.

En relación a los datos de absorbancia de anticuerpos obtenidos en el laboratorio, se realizó un Modelo lineal generalizado Binomial para cada uno de los grupos estudiados.

Con el método estadístico ANOVA se estudiaron los distintos tiempos en los que se sangraron los animales: tiempo 0, tiempo 30, tiempo 60, tiempo 90 y tiempo 180, estableciéndose las relaciones entre los mismos y las diferencias en los títulos de anticuerpos entre cada intervalo, para cada grupo.

El método estadístico utilizado para el análisis de datos de signos clínicos fue el mismo que el utilizado para la evaluación de los títulos de anticuerpos (ANOVA). Para evaluar la asociación entre el grado de pigmentación y la presencia de enfermedad clínica, se utilizó el método de distribución de Pearson (χ^2).

10. RESULTADOS

Observación de campo

Para cada tiempo estudiado (t0, t30, t60, t90, t130 y t180) se observaron y registraron distintos grados de signos clínicos en los animales, en los diferentes grupos. Los animales afectados representaron un 53,2%, mientras que los animales sanos (que no presentaron ningún grado de enfermedad) representaron un 46,8% del total de animales estudiados desde el tiempo 0 al tiempo 180. Dentro de los animales enfermos existieron una variedad de grados de la enfermedad, principalmente en el tiempo 180 que corresponde a la época de mayor prevalencia de QIB.



Figura 1. Animal con signos clínicos compatibles a un grado 1 de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) al tiempo 180 del ensayo. Fotografía propia, 2021.



Figura 2. Animal con signos clínicos compatibles con un grado 2 de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB). Queratitis, opacidad corneal y dilatación de vasos episclerales. Tiempo 180 del ensayo. Fotografía propia, 2021.



Figura 3. Animal con signos clínicos compatibles a un grado 3 de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB), con presencia de úlcera corneal. Tiempo 180 del ensayo. Fotografía propia, 2021.

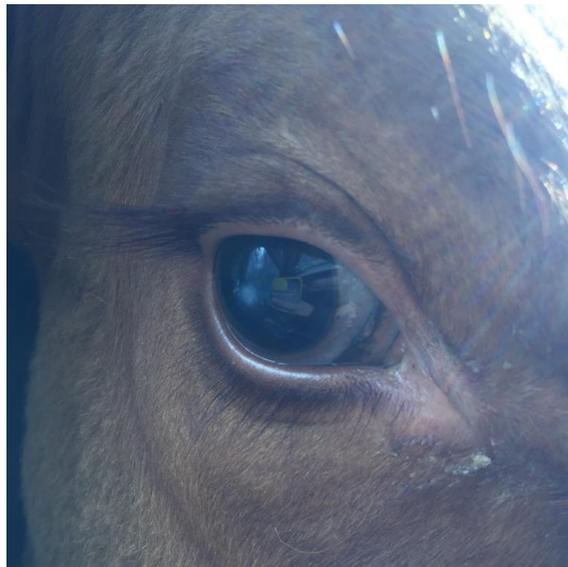


Figura 4. Animal con signos clínicos compatibles con un grado 4 de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB). Tiempo 180 del ensayo. Fotografía propia, 2021.

Análisis de datos de signos clínicos:

A continuación, se presentan los resultados de los signos clínicos presentes en los animales de cada grupo a diferentes tiempos (t60, t90, t130, t180). Para cada tiempo, se indica el número de animales que presentaron sintomatología, especificando la distribución de grados clínicos (del 1 al 4), o la ausencia de enfermedad (sanos) (Fig. 5).

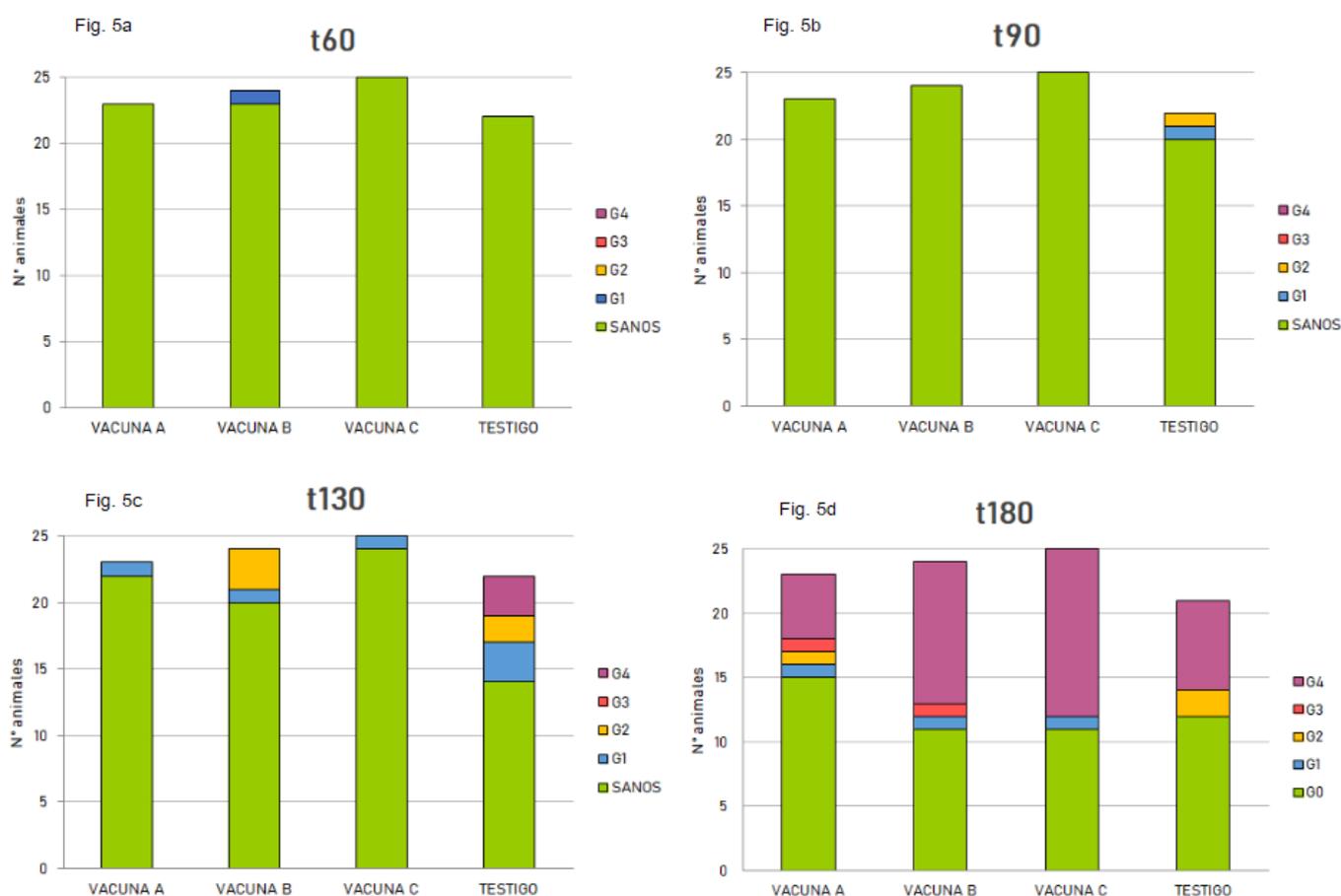


Figura 5. Distribución de grados clínicos de enfermedad según cada grupo, en los distintos tiempos del ensayo (5a t60, 5b t90, 5c t130, 5d t180).

Al tiempo 0 y 30 días no se observaron signos clínicos compatibles con la enfermedad, posiblemente debido a que correspondió con los meses de invierno junio y julio, por lo que no fueron incluidos en el análisis.

Al tiempo 60 del ensayo se observaron los primeros signos clínicos compatibles con QIB en el rodeo en el grupo inmunizado con la vacuna B. Sin embargo, la mayoría de los animales permanecían sanos (Fig. 5a). Con el transcurso del tiempo, se observaron signos clínicos en los demás grupos. Al tiempo 90 se constataron distintos grados de la enfermedad en el grupo testigo, aunque continuaron predominando los animales sanos (Fig. 5b). Al tiempo 130 ya se observaron casos clínicos en todos los grupos (Fig. 5c). Al final del ensayo, a tiempo 180, se registró la

mayor cantidad de signos clínicos en todos los grupos, los cuales, en su mayoría correspondían a un grado 4 de la enfermedad (curación) (Fig. 5d).

Los registros del tiempo 130 fueron evaluados estadísticamente y no existieron diferencias significativas en el número de animales enfermos entre el grupo Testigo y el de la vacuna B. Sin embargo, si se presentaron diferencias significativas entre el grupo Testigo y las vacunas A y C, que representaron una menor incidencia de QIB en los grupos inmunizados con las mismas.

A su vez, se evaluaron estadísticamente los registros del tiempo 180, donde no existieron diferencias significativas entre el número de animales enfermos, independientemente de los distintos grados de lesión, entre ninguno de los grupos.

Diagnóstico bacteriológico

A partir de los hispados subconjuntivales realizados a aquellos animales con sintomatología clínica compatible con QIB, se buscó la presencia de *Moraxella* spp., lográndose su aislamiento en placas de agar sangre. Las colonias sospechosas de este microorganismo presentaron morfología circular, color blanco-grisáceas, de 1 a 3 mm de diámetro y productoras de beta hemólisis (Fig. 6). Como resultado a la tinción de Gram se observaron coco-bacilos Gram negativos. Este resultado es muy relevante ya que confirma la circulación pre-dial de la bacteria, por lo que podemos atribuir la sintomatología clínica observada a cuadros de QIB.



Figura 6. Crecimiento de colonias bacterianas de *Moraxella* spp. en agar sangre ovina al 4% (24 horas a cultivo). Departamento de Microbiología de Facultad de Veterinaria. Fotografía propia, 2021.

Asociación de la pigmentación ocular con la presencia de signos clínicos

Se registraron los datos de pigmentación ocular de todos los animales del ensayo, especificando el grado de pigmentación en cada ojo. Del total de animales, un 64,9% presentaban un 100% de pigmentación ocular. Los animales sin ningún grado de pigmentación ocular representaron un 6,4% del total. Por otro lado, también se registraron animales con grados variables de pigmentación ocular que representaron un 28,7% del total.

A continuación, se presentan los porcentajes de animales enfermos y sanos según el grado de pigmentación ocular (Fig. 7). Dentro de los animales con un 100% de pigmentación ocular, un 54,1% presentaron signos clínicos compatibles con QIB, mientras que el 45,9% restante no se enfermaron. En cuanto a los animales con ojos despigmentados, el 66,7% se enfermaron, mientras que el 33,3% restante se mantuvieron sanos. En el caso de los animales con grados de pigmentación variable, el 48,1% de los mismos se enfermaron mientras que el 51,9% restante no enfermó. Por tanto, podemos destacar un porcentaje mayor de animales enfermos en el grupo sin pigmentación ocular.

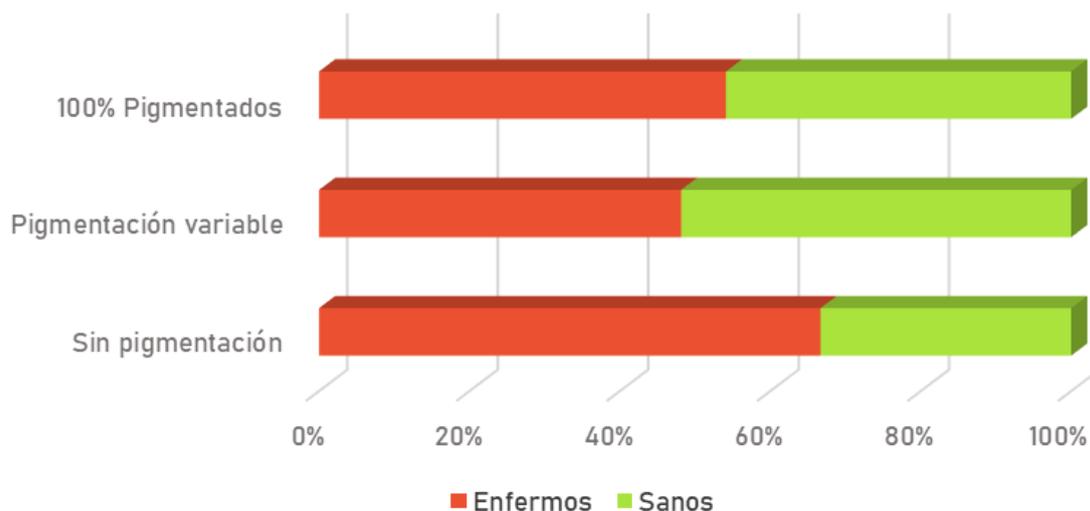


Figura 7. Distribución de animales enfermos y sanos según su grado de pigmentación ocular.

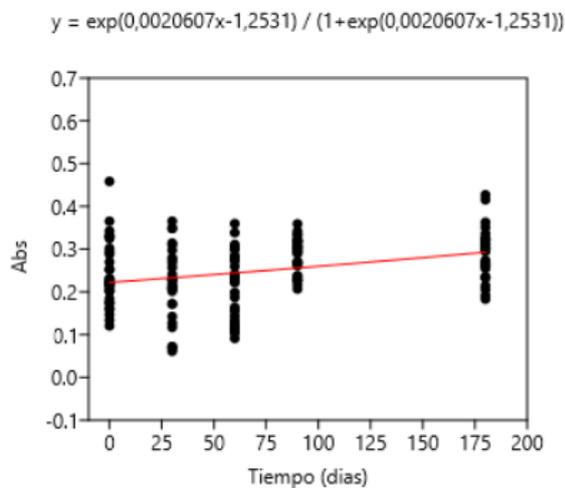
Sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas entre el grado de pigmentación y la condición de sano o enfermo.

Determinación de la respuesta inmune humoral

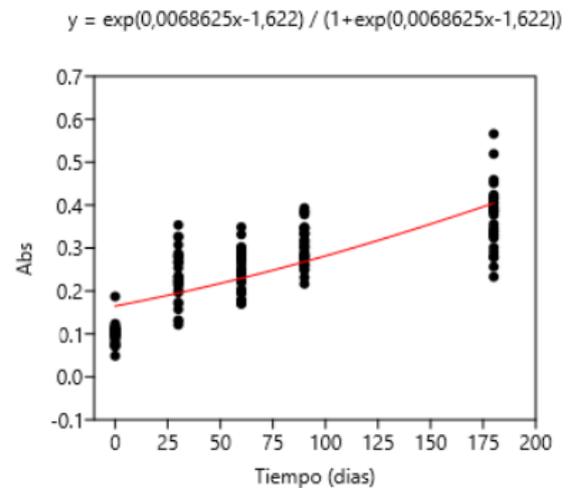
Se evaluó la respuesta de anticuerpos IgG anti-proteínas totales de *M. bovis* Epp63 mediante ELISA en los 4 grupos de bovinos a lo largo del tiempo (180 días). Cada suero se sembró por triplicado. Previo al cálculo de los promedios, se restó el blanco (promedio de los valores de absorbancia de los pocillos que no recibieron ningún suero problema).

Para la interpretación de los resultados, los grupos de animales inmunizados, correspondientes a cada formulación y el testigo se graficaron individualmente. En cuanto a los distintos grupos vacunados, según Test de distribución normal, los grupos Testigo, Vacuna A y Vacuna B no presentaron distribución normal, mientras que el grupo correspondiente a la Vacuna C si presentó una distribución normal. Por tanto, se utilizaron tests no paramétricos para la evaluación estadística de los datos.

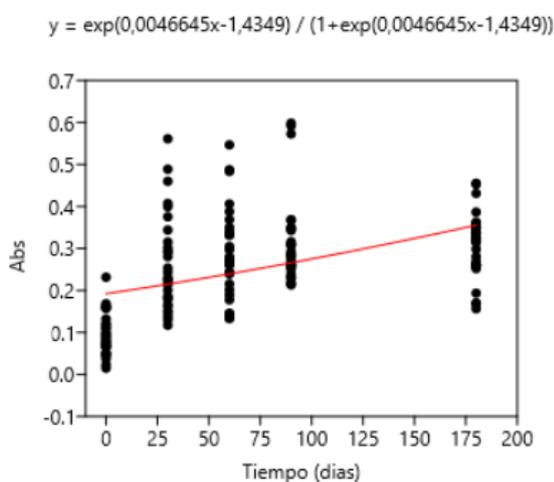
Primeramente, se utilizó un Modelo Lineal Bivariado (LM) de forma de representar la tendencia en cada animal durante todo el ensayo (Past 3.10) y se analizó cada animal individualmente puesto que cada uno responde de forma diferente (Fig. 8). En relación a esto, se observaron pendientes positivas para todos los grupos de animales (vacunados y control), lo que indica un aumento de los títulos de anticuerpos a lo largo del tiempo (Fig. 8). Al evaluar en particular el T180 con respecto a T0, se observó que los 3 grupos de animales vacunados presentaron un aumento significativo de los niveles de anticuerpos a tiempo final (180) con respecto al inicial. Mientras que el grupo Testigo (el cual no fue inmunizado) no mostró un aumento significativo de los anticuerpos en el mismo periodo de tiempo.



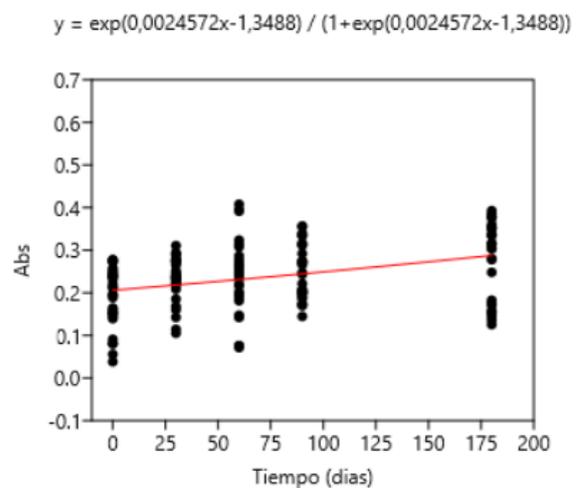
1a



1b



1c



1d

Figura 8. Modelo lineal generalizado (LM, distribución Gamma, logit). Absorbancia medida a 415 nm en los diferentes grupos (1a. Testigo; 1b Vacuna A; 1c Vacuna B, 1d. Vacuna C) en el tiempo.

Posteriormente, la respuesta de anticuerpos en cada grupo y a los distintos tiempos se evaluó por Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's Posthoc (Past 3.10), considerándose significativo un p -valor $< 0,05$.

En la Fig. 9 se muestran los resultados observados en relación a los niveles de anticuerpos medidos en Absorbancia (415 nm) y analizados estadísticamente mediante ANOVA en cada grupo de animales.

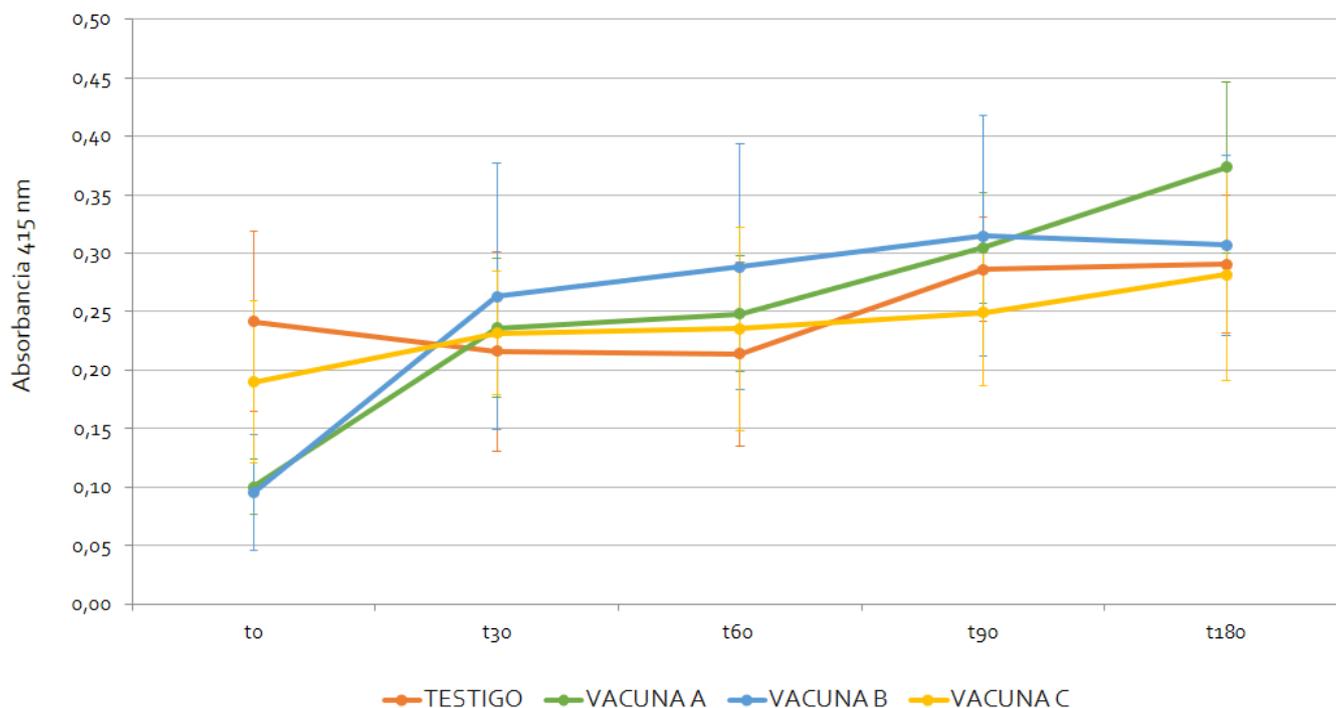


Figura 9. Respuesta de IgG séricos anti proteínas totales de *M.bovis* Epp63 (Absorbancia 415 nm) para cada grupo estudiado en el tiempo.

VACUNA A:

En todos los tiempos se observó un aumento significativo de anticuerpos en relación al tiempo 0 (Fig. 9, línea verde). En el primer intervalo de tiempo (t0-t30), el cual coincide con la administración y respuesta de la primera dosis de la vacuna, se observó un aumento significativo de Acs. Sin embargo, en el intervalo de tiempo entre t30 y t60 (asociado a la segunda dosis de la vacuna) no existe un aumento significativo de Acs. En los siguientes intervalos, tanto entre t60 y t90, como entre t90 y t180, hubo un aumento significativo de Acs. En este caso, los tiempos coinciden con el inicio de la primavera, época en la que comienza a manifestarse la enfermedad en la mayoría de los rodeos.

VACUNA B:

La vacuna B presentó un aumento significativo de anticuerpos entre el tiempo 0 y tiempo 30, intervalo que coincide con la administración de la única dosis de esta vacuna. En los siguientes periodos no se observó un aumento significativo de los niveles de anticuerpos (Fig. 9, línea azul). Esto no quiere decir que no haya habido un aumento de anticuerpos desde el tiempo 30 en adelante, sino que no fué significativo.

VACUNA C:

A los animales que recibieron esta vacuna, al igual que los que recibieron la vacuna A, fueron tratados con 2 dosis separadas por 21-30 días. En los valores de anticuerpos de este grupo se determinó un aumento significativo a partir del tiempo 60 con respecto a los valores de anticuerpos presentados a tiempo 0 (Fig. 9, línea amarilla). Es decir que los tiempos 60, 90 y 180 presentaron un aumento significativo de anticuerpos con respecto al tiempo inicial. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el aumento entre los periodos (t60-t90 y t90-t180).

Comparación de la respuesta inmune humoral entre las diferentes vacunas

A continuación, se compararon los resultados de los niveles de IgG entre los grupos de bovinos vacunados y en los diferentes tiempos estudiados. Se evaluaron las relaciones T180/T0, T90/T0, T60/T0 y T30/T0 para cada grupo, obteniéndose los siguientes resultados:

En todas las relaciones, los animales vacunados con las vacunas A y B presentaron diferencias significativas en el aumento de anticuerpos con respecto a la vacuna C y al grupo Testigo. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, los animales vacunados con la vacuna C y el grupo Testigo no presentaron diferencias significativas en el aumento de sus niveles de Acs evaluado en estos tiempos.

Asociación datos de absorbancia y grados clínicos de la enfermedad

Se compararon los valores de absorbancia obtenidos en el laboratorio y los grados clínicos de la enfermedad presentes a nivel de campo (Fig. 10). Observamos que a medida que transcurre el tiempo, la variedad de grados clínicos de enfermedad aumenta, lo que se asocia a la época más prevalente de QIB. Mientras que al comienzo del ensayo, la mayor proporción de animales no presentaba ningún signo clínico (Grado 0 = sanos).

A su vez, se observó un aumento en el nivel de anticuerpos IgG anti proteínas totales de *M. bovis* Epp63, el cual en el caso de los grupos A y C, fue más marcado en el intervalo t0-t30. A su vez, cabe mencionar que al inicio del ensayo (t0) estos dos grupos presentaron valores de absorbancia más bajos (Fig. 10).

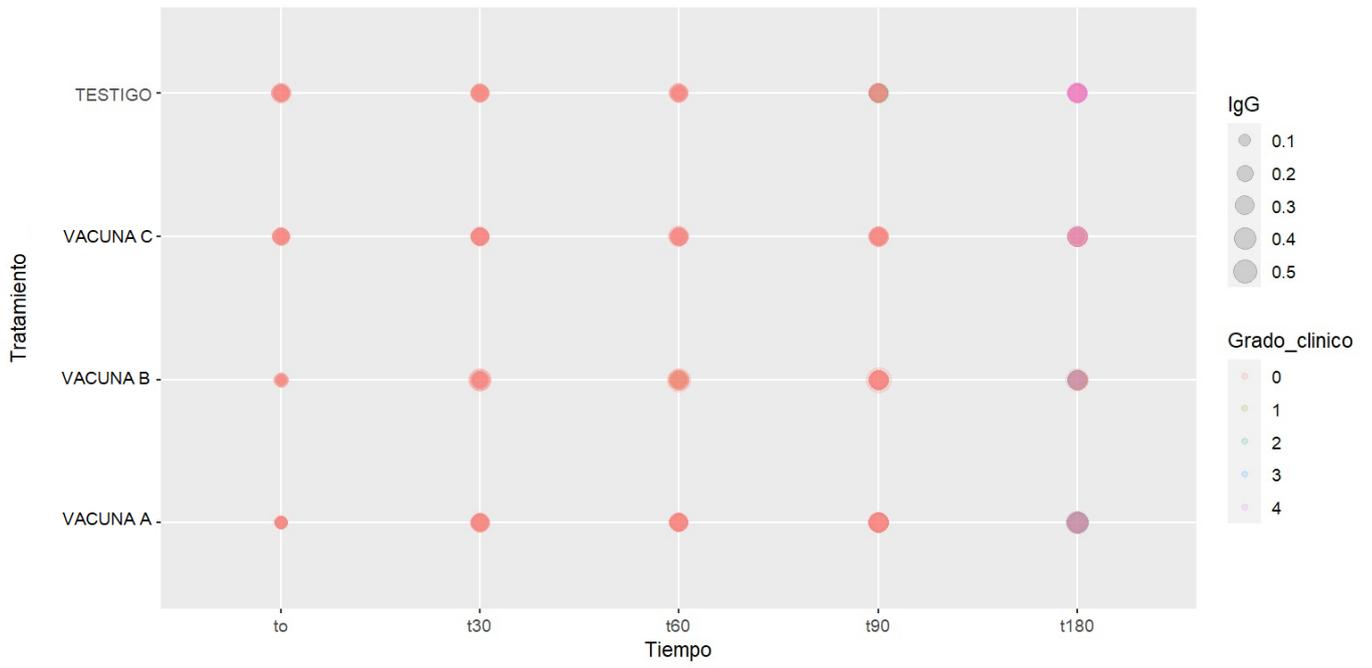


Figura 10. Nivel de anticuerpos IgG anti proteínas totales de *M. bovis* Epp63 (Absorbancia 415 nm) y grados clínicos de la enfermedad según vacunas.

11. DISCUSIÓN

La QIB genera un impacto económico y productivo en los rodeos en Uruguay, y sin embargo, no existen estudios a nivel nacional que informen acerca de la inmunidad generada por las vacunas comerciales existentes contra QIB, y a su vez existen pocos datos acerca de las cepas existentes y circulantes de *Moraxella* spp. en nuestro país (Acquistapace, 2014). Debido a esto, consideramos necesario seguir profundizando en esta problemática para obtener más información y respuestas, con el fin de desarrollar tecnologías adecuadas para los productores nacionales, lo que justificó esta investigación.

La respuesta de los bovinos frente a una inmunización está determinada por varios factores, los cuales se pueden dividir en ambientales, propios del animal y los relacionados al agente causal. En cuanto al ambiente, todos los terneros utilizados para el estudio fueron del mismo sexo (machos) y de la misma generación. Los mismos fueron sometidos a un destete a los 80 días de iniciado el ensayo aproximadamente (con 5 a 7 meses de edad), y siempre estuvieron expuestos a las mismas medidas de manejo y condiciones ambientales. En relación a los factores individuales propios de cada animal, debemos considerar la genética, variaciones en el peso, estado de salud, enfermedades concurrentes, grado de pigmentación ocular, entre otros. Respecto a la pigmentación ocular, los animales presentaban una amplia variabilidad de grados de pigmentación, observándose una tendencia a mayores casos de presentación clínica de la enfermedad en los animales despigmentados. A su vez, se constató la presencia de Dermatomicosis en algunos terneros, con lesiones principalmente en la cara, lo que pudo influenciar la patogenia de la enfermedad y la respuesta inmune en los animales (Snowder et al., 2005). En cuanto al agente, el desconocimiento de las cepas circulantes de *Moraxella* spp. en el predio problema es una limitante, ya que en caso de que existiera una diferencia entre éstas y las cepas utilizadas en las vacunas comerciales, tendríamos un punto muy importante para estudiar y entender en mayor medida el comportamiento de la inmunización en los animales.

A su vez, las variaciones que existieron en el nivel inicial de anticuerpos (que se obtuvieron en el sangrado previo a la vacunación) en los diferentes grupos, inciden negativamente sobre la comparabilidad de los mismos, lo cual nos obliga a cuestionarnos cuál hubiese sido el resultado si los animales hubiesen partido de la misma condición de protección, o incluso si hubieran partido de niveles más bajos. Si bien se estableció entre 2 a 4 meses como tiempo mínimo de espera luego del nacimiento para evitar la interferencia con los anticuerpos maternos; quizás esos dos meses fueron reflejo de la variación en los niveles de anticuerpos individuales que se presentó al iniciar el ensayo. La presencia de antecedentes de QIB en el predio, y el hecho de que *M. bovis* es considerada un patógeno oportunista, que se encuentra presente en la conjuntiva de animales sanos, también puede ser reflejo de esta variabilidad individual en el valor de anticuerpos iniciales. Al evaluar el nivel de Acs a lo largo del tiempo, se observó un aumento significativo desde el tiempo 0 al tiempo 180 en todos los grupos inmunizados, pero al partir de títulos distintos, no podemos afirmar que la efectividad de una vacuna es mayor que otra solamente por el hecho de que en el último tiempo estudiado el valor en uno de los grupos es más alto.

Cabe destacar además que las madres no presentaban inmunidad específica contra QIB, por lo que los anticuerpos transferidos mediante el calostro a sus hijos,

probablemente correspondieron a los desarrollados a partir de su propia exposición natural a *M. bovis*, considerando los antecedentes prediales.

Dentro de los grupos vacunados, dos de los mismos generaron una respuesta inmune humoral que se diferenció significativamente con la generada por los animales del grupo control. Estos últimos, fueron únicamente expuestos naturalmente al agente presente en el establecimiento. Se pudo observar que el pico de anticuerpos de los animales del grupo control se ubicó más cercano a la época prevalente de QIB (primavera-verano), momento del desafío natural a *M. bovis*, mientras que en los animales vacunados el pico se dio asociado a la vacunación (en invierno), por lo que efectivamente podemos decir que existió una respuesta a las vacunas. Lo que por el momento queda inconcluso, es contra qué antígenos específicos se generan los anticuerpos luego de la vacunación y cuál es la capacidad de protección que tienen los mismos frente a *M. bovis* y el desarrollo de la enfermedad clínica.

A su vez, al observarse durante el comienzo de la época de QIB (t130) que los animales inmunizados con la vacuna B, se enfermaron al igual que los del grupo testigo, podemos sospechar que el grupo B desarrollo una inmunidad más corta en el tiempo, la cual puede atribuirse a su única dosis, a diferencia de las demás vacunas que si presentaron diferencias significativas en el número de animales enfermos con el grupo testigo, y se administraron 2 dosis. Estos resultados nos llevan a considerar que las revacunaciones pueden tener un impacto importante en el desarrollo y la permanencia de la inmunidad en el tiempo. Sin embargo, a tiempo 180 (fin del ensayo), momento de mayor exposición al agente, todos los grupos enfermaron por igual, lo que podría indicar que la inmunidad generada por las vacunas es transitoria.

Es importante considerar que en este trabajo se obtuvieron muestras de sangre para la detección de anticuerpos sistémicos, no oculares. La prueba que se realizó para detectar los mismos en las muestras de suero fue un ELISA contra proteínas totales de *M. bovis*. Es decir, esta prueba no nos brinda información acerca del tipo específico anticuerpos que generaron los animales. Y por tanto, no podemos afirmar que los anticuerpos presentes en el suero efectivamente protegen contra la enfermedad. Se ha observado en otros trabajos que los animales presentan un mayor grado de protección contra QIB cuando se producen anticuerpos IgA a nivel de la película lagrimal. Dicha concentración está influenciada por la vía de administración de la vacuna y los niveles máximos de IgA se alcanzan cuando la vacunación es a nivel de mucosas, en este caso la mucosa ocular. De hecho, los anticuerpos séricos y sus distintos niveles, parecen estar pobremente relacionados con la protección contra la enfermedad (Nayar y Saunders, 1975). En estudios anteriores, se constató un incremento moderado en los niveles de IgA en las secreciones lacrimales en animales con signos de QIB severa, mientras que no se observó un incremento de IgA en secreciones de terneros con signos leves de la enfermedad. En el primer caso, la infección ocular severa provocada por *M. bovis*, estimuló la producción de anticuerpos secretorios específicos. Sin embargo, el rol exacto de estos anticuerpos específicos contra *M. bovis* no están completamente estudiados, pero los resultados llevan a considerar que la enfermedad podría ser prevenida de una manera más eficiente con métodos de vacunación local (Nayar y Saunders, 1975). Por tanto, la medición de anticuerpos a nivel ocular sería una herramienta más precisa para evaluar el nivel de protección del rodeo, utilizando pruebas de laboratorio más específicas. A su vez, la utilización de factores de

virulencia como las fimbrias, para la sensibilización de las placas de ELISA, podría ser una alternativa más específica para esta técnica, con el fin de obtener datos más certeros sobre el tipo de inmunidad generada por los animales.

En los tres grupos vacunados, la inmunización fue por vía sistémica, mientras que la presentación de la enfermedad está siempre asociada al globo ocular y sus anexos, generando pérdidas asociadas a los síntomas oculares que impiden la correcta alimentación de los animales y por tanto influyen directamente en la producción ya sea de carne o leche. Por lo tanto, creemos que una de las limitaciones que podría estar influyendo en la protección de los animales a la infección es la vía de administración de las vacunas. En este sentido, es necesario continuar trabajando para poder obtener vacunas que generen una respuesta más específica en el sitio de asiento de la enfermedad.

A modo comparativo, estudios realizados en relación al virus de Fiebre Aftosa y el rol de la respuesta inmune sistémica y de mucosas frente a esta enfermedad, indicaron que los anticuerpos sistémicos no impiden la replicación primaria del virus en mucosas, pero una vez que el mismo accede a la circulación, éstos pueden neutralizarlo si se encuentran en cantidades suficientes, previniendo su acceso a otros tejidos (Barrionuevo, 2018). En este mismo estudio, la vacunación estimuló el desarrollo de una respuesta madura de anticuerpos séricos con títulos elevados de IgG1 e IgG2, niveles basales de IgM y una avidéz mayor al 60%. La posterior infección oronasal generó respuestas secundarias rápidas tanto a nivel sistémico como en mucosas, con números de CSA (Células Secretoras de Anticuerpos) predominantes para IgG1, seguidas de IgG2 e IgM, y un aumento del índice de avidéz de los anticuerpos sistémicos alcanzando casi el 100% luego de 6 días post infección (Barrionuevo, 2018).

Se ha demostrado que los anticuerpos sistémicos son incapaces de asociarse a la replicación primaria del Virus de la Fiebre Aftosa en la nasofaringe y su diseminación a tejidos pulmonares que le permiten acceder a la circulación sanguínea (Arzt, Pacheco y Rodriguez, 2010). Sin embargo, sí pueden hacerlo en sangre, eliminándolo de la circulación (McCullough et al., 1992), disminuyendo el número de partículas virales infecciosas capaces de infectar tejidos distales.

Considerando estos antecedentes y los resultados de esta tesis, la vacunación contra QIB por vía sistémica probablemente esté asociada con una disminución en la severidad de los signos clínicos o duración de la enfermedad, pero no impediría la replicación primaria de *M. bovis* en el globo ocular. Asociado a esto, la presencia de enfermedad en todos los grupos evaluados en esta tesis (vacunados y control), sin diferencias significativas entre los mismos, es reflejo de que la infección de los animales no se pudo prevenir con las vacunas. Podemos afirmar que las vacunas comerciales evaluadas generan una respuesta inmune en los animales, ya que se detectaron niveles crecientes de anticuerpos sistémicos luego de la vacunación. Pero la eficacia de esta respuesta inmune se pone en duda cuando constatamos grados clínicos de QIB de igual manera en el grupo control que en los grupos inmunizados.

Por otro lado, la composición de las vacunas es un factor determinante en la respuesta que generan los animales. Ya que, como se mencionó anteriormente, *M. bovis* es una bacteria con una gran variedad de factores de virulencia y capacidad de mutación, y la mayoría de las vacunas se producen en base a cepas de referencia fimbriadas, que no necesariamente coinciden con las cepas de campo.

A su vez, en un estudio anterior, se extrajeron Proteínas de Membrana Externa (PME) de cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* y se evaluó la reactividad de las mismas frente a sueros y lágrimas de bovinos no infectados e infectados con *Moraxella* spp., donde se constató una reacción de anticuerpos tanto en animales sanos como en los enfermos (Aquistapace, 2014). La presencia de anticuerpos contra *Moraxella* spp. en animales sanos puede estar debida a antecedentes de exposición previa o a la presencia del microorganismo como parte de la microbiota ocular normal (Pugh et al., 1986; O'connor et al., 2012 citados por Aquistapace, 2014), lo que consideramos un potencial factor implicado en la respuesta inmune que desarrollan los animales cuando son inmunizados.

Otra práctica ocasionalmente utilizada en nuestro país para la prevención de QIB son las autovacunas o vacunas autógenas, las cuales son realizadas a partir de aislamientos de agentes obtenidos de muestras tomadas en un predio problema. Esto apunta a que la respuesta inmune se dirija específicamente hacia los agentes existentes en ese rodeo. En este sentido, estudios previos revelaron que, ante dos grupos, uno inmunizado con una autovacuina y otro inmunizado con una vacuna comercial, el grupo correspondiente a la vacuna autógena mostró una menor incidencia de enfermedad clínica de QIB y menor necesidad de re tratamientos, aunque estadísticamente no fue significativo (Hille et al., 2022).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de signos clínicos en animales vacunados y no vacunados, podemos concluir que en este ensayo en particular, los animales que fueron vacunados, independientemente de la vacuna comercial que se utilizó, se enfermaron al igual que los animales que no fueron inmunizados. Este resultado permite que nos cuestionemos la eficacia de las vacunas que se utilizan hoy en día a campo para la prevención de la enfermedad, sus vías de administración, composición, y medidas de manejo asociadas a la inmunización, entre otros factores que pueden estar asociados en la respuesta inmune de los animales.

Teniendo en cuenta la ausencia de datos estadísticamente significativos en referencia a la presencia de síntomas entre los distintos grupos, y la interrogante que genera en cuanto a la eficiencia de las vacunas, al momento consideramos que el manejo integral temprano de la enfermedad es clave para la prevención de la QIB. Este manejo incluye un conjunto de acciones que acompañan la vacunación, ya que esta última no es la única medida a tomar frente a la QIB.

La inmunización de los animales es una herramienta para la prevención de la enfermedad, y a la que se debe este estudio. Es importante que la misma se realice previo al destete o cercano al mismo, momento en el cual los animales se enfrentan a condiciones estresantes y disminuyen su inmunidad, y que a su vez se asocia muchas veces a la época más prevalente de QIB (verano). Es importante que el manejo de los animales se realice evitando en la mayor medida posible el estrés y traumatismos especialmente en esta etapa. Que los mismos tengan acceso a sombra y siempre acompañar con una buena nutrición y sanidad del rodeo. El pastoreo de los animales debe realizarse sobre campos limpios, evitando potenciales agresores como el forraje grosero y pastos encañados. A su vez, debemos integrar dentro de las medidas de manejo, el control de la mosca, ya que la misma es considerada un vector mecánico activo en la transmisión de la enfermedad. Por otro lado, el manejo diferencial en la época de aparición de enfermedad, el reconocimiento y aislamiento precoz de animales con sintomatología compatible con QIB y el tratamiento de los mismos, también son fundamentales

para el control. Debemos evitar el contacto estrecho entre animales enfermos y sanos, y realizar un tratamiento precoz de los enfermos (en etapas tempranas de QIB). Para el tratamiento de los animales, la administración de antibióticos por vía subconjuntival puede ser una herramienta útil a aplicar con mayor frecuencia en los rodeos afectados, considerando que con estos las concentraciones del fármaco a nivel ocular son mayores (George, 1990), aunque también existen otras alternativas como tratamientos tópicos con colirios, polvos, aerosoles o ungüentos, o la utilización de antibióticos sistémicos.

La utilización de razas más resistentes a la infección también es considerada una medida para la prevención de QIB.

Por último, consideramos que es importante estudiar el rol de las autovacunas para QIB mediante el aislamiento del agente en el predio, ya que éstas representan una herramienta útil y accesible para los productores de nuestro país. Actualmente no existen estudios a campo en Uruguay que brinden información certera sobre la eficacia de las mismas frente a la QIB. Pero teniendo en cuenta estudios internacionales, y el fundamento por el cual se realizan las autovacunas, la utilización de las mismas en predios con QIB endémica podría significar un aumento en la resistencia de los animales a la infección, y por tanto, una disminución de las pérdidas económicas debidas a esta enfermedad.

12. CONCLUSIONES

A tiempo 130, se observó una diferencia significativa en el número de animales enfermos entre los grupos inmunizados con las vacunas A y C, (menos animales con signos) con el grupo Testigo. Sin embargo, la vacuna B no presentó diferencias con el grupo Testigo.

La vacunación contra QIB no se asoció con una menor incidencia de la enfermedad a tiempo 180.

Las vacunas con mayor título de anticuerpos no están asociadas a una menor presentación de enfermedad clínica en el rodeo. Los animales enfermaron de igual manera, independientemente de su condición de vacunados o no vacunados.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Acquistapace, S. (2014). *Proteínas de membrana externa de Moraxella Bovis y Moraxella Bovoculi como componentes de vacunas contra la queratoconjuntivitis bovina* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo.
- Aikman, J., Allan, E., y Selman, I. (1985). Experimental production of infectious bovine keratoconjuntivitis. *The Veterinary Record*, 117(10), 234-239.
- Alberti, A., Addis, M.F., Chessa, B., Cubeddu, T., Profiti, M., Rosati, S., ... Pittau, M. (2006). Molecular and antigenic characterization of Mycoplasma bovis strain causing an outbreak of infectious keratoconjuntivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(1), 41-51.
- Alexander, D. (2010). Infectious Bovine Keratoconjuntivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26 (3), 487-503.
- Álvarez, G. (2020). Queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Revista del plan agropecuario*, 176, 41-43.
- Angelos, J., Hess, J., y George, L. (2001). Cloning and characterization of a Moraxella bovis cytotoxin gene. *American Journal of Veterinary Research*, 62(8), 1222-1228.
- Angelos, J., Spinks, P., Ball, L., y George, L. (2007). Moraxella bovoculi sp. Nov., isolated from calves with bovine keratoconjuntivitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 789-795.
- Angelos J. (2007). Identification and characterization of complete RTX operon in Moraxella bovoculi and Moraxella ovis. *Veterinary microbiology*, 125(1-2) 73-79.
- Angelos, J. (2010). Moraxella bovoculi and Infectious Bovine Keratoconjuntivitis: Cause or Coincidence? *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 26 (1), 73-78.
- Angelos, J. (2015). Infectious Bovine Keratoconjuntivitis (Pinkeye). *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 31(1), 61-79.
- Arends, J., Wright, R., Barto, P., y Lusbya, A. (1984). Transmission of Moraxella bovis from Blood Agar Cultures to Hereford Cattle by Face Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 77(2), 394-398.
- Arzt, J., Pacheco, J., y Rodriguez, L. (2010). The Early Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Cattle After Aerosol Inoculation: Identification of the Nasopharynx as the Primary Site of Infection. *Veterinary Pathology*, 47(6) 1048-1063.
- Barrionuevo F.M. (201). *Inmunidad adaptativa y protectora contra el Virus de la Fiebre Aftosa en bovinos: rol de las respuestas inmunes sistémica y de mucosas*. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Bateman, K., Leslie, K., y Scholl T. (1986). A Field Trial of a Piliated Moraxella bovis Bacterin for the Prevention of Infectious Bovine Keratoconjuntivitis. *Canadian Veterinary Journal*, 27(1), 23-27.

- Billson, F., Harbour, C., Michalski, W., Tennet, J., Egerton J., y Hodgson J. (2000). Characterization of Hemolysin of *Moraxella bovis* Using a Hemolysis-Neutralizing Monoclonal Antibody. *Infection and Immunity*, 68(6), 3469-3474.
- Billson, F., Hodgson, J., Egerton J., Lepper, A., Michalski, W., Schwartzkoff, C., ... Tennet, J. (1994). A haemolytic cell-free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *FEMS Microbiology Letters*, 124(1), 69-73.
- Blood, D.C., Henderson, J.A., y Radostis, O.M. (1988). Enfermedades causadas por bacterias. En *Medicina Veterinaria* (6ª ed., pp. 281-284). Mexico: Interamericana.
- Blood, D.C., y Radostits, O.M (1992). Enfermedades causadas por bacterias. En *Medicina Veterinaria* (7ª ed., Volúmen 1, pp. 750-753). Madrid: Interamericana.
- Brown, M., Brightman, A., Fenwick, B., Rider, M. (1998). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review. *Journal of veterinary internal medicine, American College of Veterinary Internal Medicine*, 12(4), 259-266.
- Burki, S., Frey, J., y Pilo, P. (2015). Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Biology*, 179(1-2), 15-22.
- Camou, T., Zunino, P., y Hortal, M. (2017). Alarma por resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Revista Médica del Uruguay*, 33(4), 278.
- Cullen, J.N., Engelken T.J., Cooper V., y O'Connor A.M. (2017). Randomized blinded controlled trial to assess the association between a commercial vaccine against *Moraxella bovis* and the cumulative incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 251(3), 345-351.
- Cullen, J.N., Lithio, A., Seetharam, A.S., Zheng, Y., Li, G., Nettleton, D., y O'Connor, A.M. (2017). Microbial community sequencing analysis of the calf eye microbiota and relationship to infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, 207, 267-269.
- Daigneault J., y George L.W. (1990). Topically applied benzathine cloxacillin for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, 51(3) 376-380.
- Davidson, H., y Stokka, G. (2003). A field trial of autogenous *Moraxella bovis* bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratoconjunctivitis in a beef herd. *Canadian Veterinary Journal*, 44(7), 577-580.
- Ely, V.L., Vargas, A.C., Costa, M.M., Oliveira, H.P., Potter, L., Raghelin, L.A., ... Botton, S.A. (2018). *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*: biofilm formation and lysozyme activity. *Journal of applied microbiology*, 126(2), 369-376.
- Erdogan, H.M. (2010). Listerial keratoconjunctivitis and uveitis (silage eye). *The veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(3), 505-510.
- Etchevarne, J., y Fernández, T. (2016). *Comportamiento clínico preclínico de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en terneros inmunizados* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

- Farn, J., Strugnell, R., Hoyne, P., Michalski, W., y Tennent, J. (2001). Molecular Characterization of a Secreted Enzyme with Phospholipase B Activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6717-6720.
- Frank, S., y Gerber, J. (1981). Hydrolytic Enzymes of *Moraxella bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(2), 269-271.
- Frisch, J. (1975). The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Animal Production*, 21(3), 265-274.
- Funk, L., O'Connor, A., Maroney, M., Engelken, T., Cooper, V., Kinyon, J., y Plummer, P. (2009). A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. *Vaccine*, 27(34), 4585-4590.
- Funk, L., Reecy, J., Wang, C., Tait R. Jr., y O'Connor A. (2014). Associations between infectious bovine keratoconjunctivitis at weaning and ultrasonographically measured body composition traits in yearling cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244 (1), 100-106.
- George, L. (1990). Antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. *The cornell veterinarian*, 80(3) 229-235.
- George, L., Angelos, J. y Ruehl, W., (2004). Stability, antigenicity, and aggregation of *Moraxella bovis* cytolysin after purification and storage. *American Journal of Veterinary Research*, 65(7), 977-983.
- George, L., Ardans, A., Mihalyi, J., y Guerra, M. (1988). Enhancement of infectious bovine keratoconjunctivitis by modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, 49(11), 1800-1806.
- George, L., Borrowman, A., y Angelos, J. (2005). Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (1), 136-142.
- George L., Smith J., y Kaswan R. (1985). Distribution of oxytetracycline into ocular tissues and tears of calves. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 8(1), 47-54.
- George L., Wilson W., Baggot J., y Mihalyi J. (1984). Antibiotic treatment of *Moraxella bovis* infection in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(10), 1206-1209.
- Gerhardt, R.R., Allen, J.W., Grene, W.H., y Smith, P.C. (1982). The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis (*Musca autumnalis*, *Moraxella bovis*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180 156-159.
- Giltner, C., Nguyen, Y., y Burrows, L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Module. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, ASM Journals*, 76 (4), 740–772.
- Gil-Turnes, C. (1983). Hemagglutination, Autoagglutination and Pathogenicity of *Moraxella bovis* Strains. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(4), 503-504.

- Gould, S., Dewell, R., Tofflemire, K., Withley, R.D., Millman, S.T., Opriessing, T., ... O'Connor, A.M. (2013). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. *Veterinary microbiology*, 164(1-2), 108-115.
- Greene, W., Grubbs, S., y Potgieter, L. (2001). Detection of shared antigenic determinants on whole *Moraxella bovis* pili by use of antisera to cyanogen bromide-cleaved *M bovis* pilus protein. *American Journal of Veterinary Research*, 62(8), 1279-1284.
- Hille, M.M., Spangler, M.L., Clawson, M.L., Heath, K.D., Vu, H.L.X., Rogers, R.E.S., y Loy, J.D (2022). A Five Year Randomized Controlled Trial to Assess the Efficacy and Antibody Responses to a Commercial and Autogenous Vaccine for the Prevention of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vaccines*, 10(6), 916.
- Hughes, E. (1981). Infectious Keratoconjunctivitis. En M. Ristic y W.I.M. McIntyre, *Diseases of Cattle in the Tropics. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* (vol 6., pp. 237–245). Dordrecht: Springer.
- Jayappa, H.G., y Lehr, C. (1986). Pathogenicity and immunogenicity of pilated and nonpilated phases of *Moraxella bovis* in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 47(10), 2217-2221.
- Kakuda, T., Sarataphan N., Tanaka, T., y Takai, S. (2006). Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 118(1-2), 141–147.
- Kneipp, M. (2021). Defining and Diagnosing Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 37(2), 237–252.
- Kopencky, K., Pugh, G., y McDonald, T. (1986). Infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, 47(3), 623-624.
- Kummeneje, K., y Mikkelsen T. (1975). Isolation of *Listeria monocytogenes* type 04 from cases of keratoconjunctivitis in cattle and sheep. *Nordisk Veterinaermedicin*, 27(3), 144-149.
- Lepper, A., y Barton, I.J. (1987). Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. *Australian Veterinary Journal*, 64(2), 33-39.
- Lepper, A., Moore, L., Atwell, J., y Tennent, J. (1992). The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, 32(2), 177-187.
- Loy, J., Clothier, K., y Maier, G. (2021). Component Causes of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis - Non-*Moraxella* Organisms in the Epidemiology of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 37(2), 295-308.
- Loy, J., Hille, M., Maier, G., y Clawson, M. (2021). Component Causes of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis -The Role of *Moraxella* Species in the Epidemiology of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 37(2), 279–293.

- Maggs, D.J., Miller, P., y Hardcover, R.O. (2018). Diseases Cornea and Sclera. En *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (6^a ed., pp. 213-253). St. Louis: Elsevier.
- Maiti, B., Shetty, M., Shekar, M., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2012). Evaluation of two outer membrane proteins, Aha1 and OmpW of *Aeromonas hydrophila* as vaccine candidate for common carp. *Veterinary immunology and immunopathology*, 149(3-4), 298-301.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., y Maguire, D. (2013). *Moraxella* species. *Clinical Veterinary Microbiology* (2^a ed., pp. 369-373). Edinburgh: Elsevier.
- Martirena, M.J., y Turrens, M. (2013). *Descripción clínica de las lesiones oftalmológicas, producidas en un brote de Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa en terneros de destete precoz* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- McCullough, K., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J., y Kihm U. (1992). Protective Immune Response against Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Virology*, 66(4), 1835-1840.
- McConnel, C., y House, J. (2005). Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. *Australian Veterinary Journal*, 83(8), 506-510.
- McConnel, C., Shum, L., y House, J.K. (2007). Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal*, 85 (1-2), 65-69.
- Mishima S. (1981). Clinical pharmacokinetics of the eye. Proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 21(4), 504-541.
- Moore, L., y Rutter J. (1989). Attachment of *Moraxella bovis* to calf corneal cells and inhibition by antiserum. *Australian Veterinary Journal*, 66(2), 39-42.
- Nayar, P., y Saunders, J. (1975). Infectious bovine keratoconjunctivitis II. Antibodies in lacrimal secretions of cattle naturally or experimentally infected with *Moraxella bovis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 39(1), 32-40.
- Nicola, I., Cerutti, F., Grego, E., Bertone, I., Gianella, P., D'Angelo, A., ... Bellino, C. (2017). Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in Piedemontese calves. *Microbiome*, 5(1), 152.
- Parte, A.C., Sardá, J., Meier, J.P., Reimer, L.C., y Joker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to de DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607-5612.
- Postma, G., Carfagnini, J., y Minatel, L. (2008). *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(6), 449-458.
- Powe T.A., Nussbaum, K.E., Hoover, T.R., Rossmann, S.R., y Smith, P.C. (1992). Prevalence of nonclinical *Moraxella Bovis* Infections in Bulls as Determined by Ocular Culture and Serum Antibody Titer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(1), 78-79.
- Pugh, G., Hughes, D., y Packer, L. (1970). Bovine infectious keratoconjunctivitis: interactions of *Moraxella bovis* and Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *American Journal of Veterinary Research*, 31(4), 653-662.

- Pugh, G., Hughes, D., y Schulz, V. (1976). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Experimental Induction of Infection in Calves with Mycoplasmas and Moraxella bovis. *American Journal of Veterinary Research*, 37(5), 493-495
- Pugh, G., McDonald, T., y Kopencky, K. (1980) Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Effects of Vaccination on Moraxella bovis Carrier State in Cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 41(2), 265-266.
- Punch P.I., Costa N.D., Chambers E.D., Slatter D.H., y Wilcox G.E. (1985). Plasma and tear concentrations of antibiotics administrated parentally to cattle. *Research in veterinary science*, 39(2), 179-187.
- Rácz, P., Tenner, K., y Szivessy, K. (1970). Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of Listeria monocytogenes into corneal epithelial cells. *Acta microbiologica Academia Scientiarum Hungaricae*, 17(3), 221-236.
- Rogers, D., Cheville, N., y Pugh, G. Jr. (1987). Pathogenesis of Corneal Lesions Caused by Moraxella bovis in Gnotobiotic Calves. *Veterinary Pathology*, 24(4), 287-295.
- Rosenbusch, R. (1983). Influence of mycoplasma preinfection on the expression of Moraxella bovis pathogenicity. *American Journal of Veterinary Research*, 44(9), 1621-1624.
- Rousseau, R., Van Landschoot, A., Gillis, A., y De Ley, J. (1991). Taxonomy of Moraellaceae fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera Moraxella, Actinobacter, and Psychrobacter and Related organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 310-319.
- Ruehl, W., Marks, C., Fernandez, R., Falkow, S., y Schoolnik, G. (1988). Purification, Characterization, and Pathogenicity of Moraxella bovis pili. *Journal of Experimental Medicine*, 168(3), 983-1002.
- Ruehl, W., Marrs, C., Beard, M.K., Shokooki, V., Hinojosa, J.R., Banks, S., ... Mattick J.S. (1993). Qpili enhance the attachment of Moraxella bovis to bovine corneas in vitro. *Molecular Microbiology*, 7(2), 285-288.
- Saleem, A., Ahmed, I., Mir, F., Ali, S., Zaidi, A. (2010). Pan-resistant Acinetobacter Infection in Neonates in Karachi, Pakistan. *The journal of infection in developing countries*, 4(1), 30-37.
- Shugart, J., Campbell, J., Hudson, D., Hibbs, C. White, R., y Clanton, D. (1979). Ability of the Face Fly to Cause Damage to Eyes of Cattle. *Journal of Economic Entomology*, 72(4), 633-635
- Smith J.A., y George L.W. (1985). Treatment of acute ocular Moraxella bovis infections in calves with a parentally administrated long-acting oxytetracycline formulation. *American Journal of Veterinary research*, 46(4), 804-807.
- Snowder, G., Van Vleck, L., Cundiff, L., y Bennett, G. (2005). Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves 1. *Journal of Animal Science*, 83(3), 507-518.
- Sosa Torres, M.V. (2013). *Bases microbiológicas de la queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina en Uruguay* (Tesis de doctorado). PEDECIBA, Montevideo.

- Stams, A. (1967). Studies in cases of experimental eye infections with *Listeria monocytogenes*. *Albrecht von Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 173(1), 1-20.
- Thrift, F., y Overfield, J. (1974). Impact of Pinkeye (Infectious Bovine Keratoconjunctivitis) on Weaning And Postweaning Performance of Hereford Calves. *Journal of Animal Science*, 38(6), 1179-1184.
- Tizard, I.R. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Turquieto, E., Chayer, R., Jorge, M., y Passucci, J. (2008). *Queratoconjuntivitis bovina actualización y análisis de casos entre 2002 y 2006 en Argentina*. Recuperado de <https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/2892/queratoconjuntivitis-bovina-actualizacion-y-analisis-de-casos-entre-2002-y-2006-en-argentina.html>.
- Umpierrez, A., Acquistapace, S., Sosa, V., Acuña, P., Reolón, E., y Zunino, P. (2015). Diversidad y distribución de genes de virulencia de *M. bovis* y *M. bovoculi* en la Queratoconjuntivitis Infecciosa en Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornada Uruguaya Buiatría* (Vol. XLIII, pp. 278-280). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Ward, D.A., y Clark E.S. (1991). Ocular pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food and animal practice*, 7(3) 779-791.
- Ward, J., y Nielson, M. (1979). Pinkeye (Bovine Infectious Keratoconjunctivitis) in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, 49(2), 361-366.
- Yu, R., y Schryvers A. (2002). Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 81-90.
- Zbrun, M.V., Zielinski, G.C., Piscitelli, H.C., Descarga, C., y Urbani L.A. (2011). Dynamics of *Moraxella bovis* infection and humoral immune response to bovine herpes virus type 1 during a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. *Journal of Veterinary Science*, 12(4), 347-352.