UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA VACUNACIÓN A CAMPO DE BOVINOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

Por

Valentina SKURAS VIGNOLI

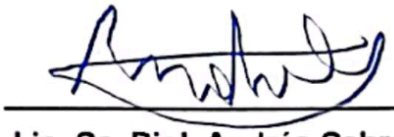
TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección-Control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2024

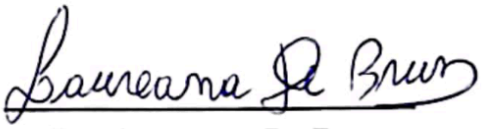
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



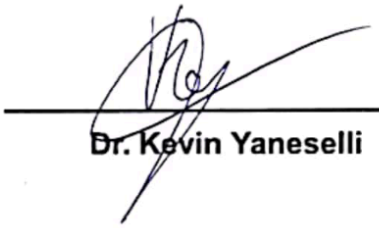
Lic. Cs. Biol. Andrés Cabrera

Segundo miembro (Tutor):



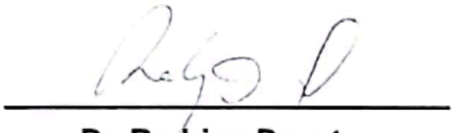
Dra. Laureana De Brun

Tercer miembro:



Dr. Kevin Yaneselli

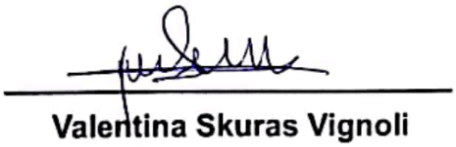
Cuarto miembro:



Dr. Rodrigo Puentes

Fecha: 09/02/2024

Autor:



Valentina Skuras Vignoli

AGRADECIMIENTOS

A la Udelar, por brindarme todos estos años de educación y oportunidades, y sobre todo por formarme como persona. Sin educación pública no hay futuro.

A Rodrigo, por haberme abierto las puertas del laboratorio y permitirme conocer este mundo tan maravilloso de la microbiología. Gracias por contagiarme tu vocación por la docencia y la investigación.

A Laureana, por ser mi instructora en todo y mi ejemplo a seguir. Gracias por siempre proponerme desafíos y por dejarme aprender de vos; tu forma de trabajar y tu compromiso son algo de otro planeta. Tenerte como referente sin duda fue (y seguirá siendo) mi inspiración para poder superarme día a día.

A mi familia, por haber creído siempre en mí. Mi mamá, motor fundamental de mi vida y la razón por la que hoy soy quien soy. Gracias por insistir tanto y por nunca dejarme caer. A mi abuela y mi hermana, gracias por darme para adelante y ayudarme a confiar en mí en los momentos complicados. A mi novio, gracias por aprender conmigo y por demostrarme que yo puedo.

A mis amigas, las que me dio la vida y las que me dio la Facultad. Ya saben que más que amigas son hermanas, gracias por la confianza, por su preocupación y sus palabras de aliento. Hicieron que este camino fuera un poco más sencillo y menos solitario. Sin su apoyo no hubiese llegado hasta donde llegué.

A todas las personas del laboratorio, las que hoy siguen y las que ya se han ido, que durante todos estos años estuvieron presentes para darme una mano cuando la necesité y para ayudarme a seguir adelante. Gracias por dejarme ser parte de sus días, de todos también aprendí.

Y a mí misma, porque a pesar de derrumbarme y muchas veces desconfiar, pude levantarme y lograr llegar hasta acá. Gracias por el esfuerzo y la perseverancia.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN……..2
AGRADECIMIENTOS……3
TABLA DE CONTENIDO……...4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS……..6
1. RESUMEN……...…7
2. SUMMARY……..8
3. INTRODUCCIÓN…..……..9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..……11
4.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA……11
4.1.1 *INTRODUCCIÓN*……..11
4.1.2 *GENOMA*……..11
4.1.3 *PREVALENCIA*……13
4.1.3.1 Prevalencia mundial……13
4.1.3.2 Prevalencia en la región……..14
4.1.3.3 Prevalencia en Uruguay……..14
4.1.4 *HUÉSPEDES*……15
4.1.5 *TRANSMISIÓN*……16
4.1.6 *PATOGÉNESIS*……16
4.1.7 *RESPUESTA INMUNE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS*……17
4.1.7.1 Carga proviral……...18
4.1.8 *IMPACTO*……..19
4.1.9 *POTENCIAL ZOONÓTICO*……...20
4.1.10 *DIAGNÓSTICO*……...21
4.1.10.1 Pruebas serológicas……..21
4.1.10.2 Detección de ADN proviral……22
4.1.11 *CONTROL Y PREVENCIÓN*……..23
4.2 RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA……26
4.2.1 *INTRODUCCIÓN*……..26
4.2.2 *DESCRIPCIÓN DEL AGENTE*……26
4.2.3 *PREVALENCIA*……27
4.2.4 *TRANSMISIÓN*……28
4.2.5 *PATOGÉNESIS*……28
4.2.5.1 Latencia de BoHV-1……29
4.2.6 *RESPUESTA INMUNE*……29
4.2.7 *MANIFESTACIONES CLÍNICAS*……..……30
4.2.8 *DIAGNÓSTICO*……31
4.2.9 *CONTROL Y PREVENCIÓN*……32
4.3 DIARREA VIRAL BOVINA……..33
4.3.1 *INTRODUCCIÓN*……..33
4.3.2 *GENOMA*……..33
4.3.3 *PREVALENCIA*……34
4.3.4 *TRANSMISIÓN*……34

4.3.5 *PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS*……35
4.3.5.1 Animales persistentemente infectados (PI)……36
4.3.6 *RESPUESTA INMUNE*……37
4.3.7 *DIAGNÓSTICO*……38
4.3.8 *CONTROL Y PREVENCIÓN*……39
4.3.8.1 Vacunación……40
5. HIPÓTESIS……42
6. OBJETIVO GENERAL……42
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……42
8. MATERIALES Y MÉTODOS……43
8.1 CARACTERIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO……43
8.2 SELECCIÓN DE ANIMALES Y CONFORMACIÓN DE LOS GRUPOS……43
8.3 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS……43
8.4 PROCESAMIENTO DE LA SANGRE EN EL LABORATORIO……43
8.5 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BLV……43
8.6 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BVDV……44
8.7 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO BVDV……44
8.8 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BoHV-1……45
8.8.1 *ANTICUERPOS TOTALES*……45
8.8.2 *ISOTIPOS IgG1 E IgG2*……45
8.9 SERONEUTRALIZACIÓN (SN) *in vitro* CONTRA BoHV-1……45
8.10 SERONEUTRALIZACIÓN (SN) *in vitro* CONTRA BVDV……46
8.11 DETERMINACIÓN DE LA CARGA PROVIRAL DE BLV MEDIANTE *ddPCR*……46
8.12 PUESTA A PUNTO CITOMETRÍA DE FLUJO……47
8.12.1 *ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES*……47
8.12.2 *MARCACIÓN DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B*……47
8.12.3 *MARCACIÓN DE INTERFERÓN gamma E IL-4* ……47
8.13 ANÁLISIS DE DATOS……48
9. RESULTADOS……49
9.1 PREVALENCIA DE BLV……49
9.2 ANTICUERPOS CONTRA BoHV-1……49
9.2.1 *ANTICUERPOS TOTALES*……49
9.2.2 *ISOTIPOS IgG1 E IgG2*……50
9.3 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BoHV-1……51
9.4 ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BVDV……53
9.5 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BVDV……54
9.6 CARGA PROVIRAL BLV……55
9.7 PUESTA A PUNTO CITOMETRÍA DE FLUJO……58
9.7.1 *MARCACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B*……58
9.7.2 *MARCACIÓN DE CITOQUINAS*……60
9.7.3 *ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON Ki67*……61
10. DISCUSIÓN……64
11. CONCLUSIONES……69
12. BIBLIOGRAFÍA……70

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figuras

Figura 1. Cinética del título de anticuerpos totales contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo……...49
Figura 2. Cinética del título de anticuerpos totales (isotipos IgG1 e IgG2) contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA in house a lo largo del ensayo…..……...50
Figura 3. Cinética del título de anticuerpos neutralizantes contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante SN *in vitro* a lo largo del ensayo.…….....52
Figura 4. Cinética del título de anticuerpos totales contra el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo……...53
Figura 5. Salida del programa de ddPCR para carga proviral de BLV…….....55
Figura 6. Carga proviral de BLV expresada en copias por nanogramo (copias/ng) de ADN, mediante ddPCR al día 0 y 60 del ensayo...……..56
Figura 7. Título de anticuerpos contra BoHV-1 y BVDV en animales vacunados según carga proviral de BLV, los días 0 y 60 del estudio..…….57
Figura 8. Determinación del Stain Index para CD4 y CD8.....58
Figura 9. Histograma de lectura por citometría de flujo para poblaciones de linfocitos CD4 y CD8….....58
Figura 10. Determinación del Stain Index para CD21……..……..59
Figura 11. Histograma de lectura por citometría de flujo para poblaciones de linfocitos CD40…….……..59
Figura 12. Determinación del Stain Index para citoquinas IL-4-FITC e IFN-Alexa647…..60
Figura 13. Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD4 BLV+.....61
Figura 14. Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD8 BLV+.....61
Figura 15. Histograma de lectura por citometría de flujo para INF gamma BLV+.....62
Figura 16. Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD4 BLV-.....62
Figura 17. Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD8 BLV-.....62
Figura 18. Histograma de lectura por citometría de flujo para INF gamma BLV-.....63

Tablas

Tabla 1: Título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1:16 contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en cada sangrado post-vacunación y según estado para BLV, mediante Seroneutralización *in vitro*…….……51
Tabla 2: Título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1:16 contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en cada sangrado post-vacunación y según estado para BLV, mediante Seroneutralización *in vitro*……54

1. RESUMEN

El virus de la leucosis bovina enzoótica (BLV) es el principal patógeno viral que afecta a la lechería mundialmente. El 90% de los animales infectados son asintomáticos y la infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune a nivel humoral y celular modificando el perfil de las células T en infecciones naturales y en vacunaciones. La diarrea viral bovina (BVD) y la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) son las principales virosis que afectan la reproducción en bovinos y en la práctica veterinaria no se tiene en cuenta la presencia de BLV como enfermedad inmunosupresora que puede disminuir la eficacia de la vacunación a las mismas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune frente a la vacunación contra el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y de la rinotraqueítis infecciosa bovina (BoHV-1) en animales infectados con BLV frente a aquellos libres de la infección. Para esto se trabajó con un grupo de bovinos Holando pertenecientes a un tambo comercial ubicado en la localidad de Berrondo, Florida (Uruguay). Previo al ensayo, los animales fueron muestreados y se les realizó un chequeo serológico frente a los tres virus, ingresando al estudio aquellos serológicamente negativos para los virus BVDV y BoHV-1. A su vez, esto permitió realizar la conformación de dos grupos, uno BLV+ (n=15) y otro BLV- (n=9). Estos animales fueron muestreados e inmunizados frente a las virosis mencionadas anteriormente con una dosis inicial al día 0 y un booster a los 24 días. Se recolectaron muestras de suero y sangre entera los días 0, 7, 24, 36 y 60 post inmunización y se determinó anticuerpos totales y seroneutralizantes contra BVDV, así como la presencia del antígeno, anticuerpos totales y neutralizantes contra BoHV-1 y cuantificación de isotipos IgG1 e IgG2, anticuerpos totales contra BLV y su carga proviral, y la puesta a punto de la citometría de flujo para analizar las poblaciones celulares con diferentes estímulos. No se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$) para anticuerpos totales entre grupos BLV+ y BLV- en relación a BoHV-1 y BVDV. Para BoHV-1 se obtuvo la respuesta máxima el día 35. El isotipo predominante fue IgG2, existiendo una pobre respuesta a IgG1. Para BVDV no hubo diferencias significativas entre el día 0 y 60, lo que demuestra una pobre respuesta de anticuerpos a la vacuna. En este trabajo no se observaron diferencias en la respuesta humoral en presencia de BLV y pone en manifiesto la baja inmunogenicidad encontrada de la vacuna contra BVDV. Se requieren continuar los estudios de la respuesta inmune celular según estatus para BLV incorporando el estado de linfocitosis persistente.

2. SUMMARY

Enzootic bovine leukosis virus (BLV) is the main viral pathogen affecting dairy farming worldwide. 90% of infected animals are asymptomatic and subclinical infection causes important dysfunctions of the immune system at the humoral and cellular level, modifying the profile of T cells in natural infections and in vaccinations. Bovine viral diarrhea (BVD) and infectious bovine rhinotracheitis (IBR) are the main viruses that affect reproduction in cattle and in veterinary practice the presence of BLV is not taken into account as an immunosuppressive disease that can reduce the effectiveness of vaccination to the same.

The objective of this work was to study the immune response to vaccination against bovine viral diarrhea virus (BVDV) and infectious bovine rhinotracheitis (BoHV-1) in animals infected with BLV versus those free of the infection. For this, we worked with a group of Holando cattle belonging to a commercial dairy located in the town of Berrondo, Florida (Uruguay). Prior to the trial, the animals were sampled and a serological check was performed against the three viruses, with those serologically negative for the BVDV and BoHV-1 viruses entering the study. In turn, this allowed the formation of two groups, one BLV+ (n=15) and another BLV- (n=9). These animals were sampled and immunized against the reproductive viruses mentioned above with an initial dose on day 0 and a booster on day 24.

Samples of serum and whole blood were collected on days 0, 7, 24, 36, and 60 post-immunization. Total antibodies and seroneutralizing antibodies against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) were determined, as well as the presence of antigen, total antibodies, and neutralizing antibodies against Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1). Additionally, quantification of IgG1 and IgG2 isotypes, total antibodies against Bovine Leukemia Virus (BLV), and its proviral load were performed. Flow cytometry was optimized to analyze cellular populations with different stimuli. No significant differences ($p>0.05$) in total antibodies were observed between BLV+ and BLV- groups in relation to BoHV-1 and BVDV. The maximum response for BoHV-1 was obtained on day 35, with IgG2 as the predominant isotype and a poor response to IgG1. For BVDV, there were no significant differences between day 0 and 60, demonstrating a poor antibody response to the vaccine. In this study, no differences were observed in the humoral response in the presence of BLV, highlighting the low immunogenicity found for the BVDV vaccine. It is necessary to continue studies of the cellular immune response according to BLV status, incorporating the state of persistent lymphocytosis.

3. INTRODUCCIÓN

El virus de la Leucosis bovina enzoótica (BLV) es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo. Tanto en Uruguay como en la región, la prevalencia serológica en rodeos lecheros puede llegar a ser muy alta, incluso en animales jóvenes (De Brun et al., 2013; Gutiérrez et al., 2011). El 90% de los animales infectados son asintomáticos (aleucémicos y con linfocitosis persistente), produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones en el sistema inmune (Bartlett et al., 2013). En Uruguay no se ha calculado las pérdidas que produce la presencia de esta enfermedad. Sin embargo, en Estados Unidos se ha estimado que la infección subclínica produce pérdidas de 95/Kg/vaca/año de leche por cada 10% de aumento de la prevalencia de BLV en los tambos infectados. Esto representa pérdidas de 285 millones de dólares anuales a los productores de ese país (Bartlett et al., 2013). El impacto del virus en la longevidad de la vaca también se ha visto que está asociada negativamente, de modo tal que vacas con mayores títulos de anticuerpos contra BLV tienen un 40% más de probabilidad de ser refugada (Bartlett et al., 2013).

Uruguay, históricamente ha tenido una tasa de procreo situado en torno al 60-70% (MGAP, 2014). Las causas de estas pérdidas son múltiples y muchas veces relacionadas entre sí. Sin embargo, se desconoce sí BLV participa de alguna manera directa o indirectamente en ese resultado. Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se ha encontrado una asociación negativa entre BLV y determinados parámetros reproductivos en vaquillonas Holando, destacándose una tasa de concepción 26% menor en vaquillonas con BLV (p=0.005) (Puentes et al., 2017). También se encontró una asociación positiva entre ser serológicamente positivo a BLV y presentar anticuerpos contra BoHV-1 y *Leptospira spp*. (Mionetto y Rodríguez, 2017). A su vez, se ha demostrado que la infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune que impacta directamente en la sanidad (Bartlett et al., 2014), como por ejemplo disminución de la función de los polimorfonucleares *in vitro* inducido por *Escherichia coli* (*E.coli*) en vacas infectadas (Souza et al., 2012), disminución de la fagocitosis de los neutrófilos y macrófagos frente a *Staphylococcus aureus* (Nieto Farias et al., 2018).

BLV no solo causa inmunodepresión sino que además genera disturbios inmunológicos a nivel de la inmunidad celular, modificando el perfil de las células T, que son claves en la regulación del sistema inmune tanto en infecciones naturales como en respuesta a inmunizaciones por vacunación. Un claro ejemplo de esto es demostrado por Nieto Farias et al. (2018) en un estudio en el cual encontraron que el porcentaje de éstas células era significativamente menor en animales con alta carga proviral, estando afectadas tanto las células T CD4+ como las T CD8+. La proporción de células T CD4 + y T CD8 + puede estar relacionada con la secreción diferencial de citoquinas en las diferentes condiciones para BLV. En efecto, se ha visto que la expresión de citoquinas en respuesta a la infección por BLV se desregula de manera significativa (Nieto Farias et al., 2018). En concordancia con esto, también existen estudios que relacionan positivamente la carga proviral con la producción de receptores inmunoinhibitorios de las células T infectadas, lo que favorece la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas de evadir la respuesta inmune,

mediante el aumento en la expresión de IL-10 y la disminución de interferón gamma (Bartlett et al., 2014).

Erskine et al. (2011) en ensayos a campo, encontraron que vacas infectadas con BLV tuvieron un menor título de IgG2 contra J5 *E. coli* (vacuna utilizada contra la mastitis) comparado con vacas no infectadas, siendo relevante ya que esta inmunoglobulina es importante para la opsonización y reconocimiento de los neutrófilos. Recientemente nuestro grupo encontró una menor producción de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa en bovinos infectados naturalmente con BLV e inmunizados a campo (Puentes et al., 2016), destacándose la importancia de la IgM en la primoinfección y de la IgG1, la inmunoglobulina que más predomina en los rumiantes. Estos resultados demuestran el posible efecto negativo de BLV sobre la respuesta inmune de animales a campo.

Por otro lado, las principales virosis que afectan la reproducción en bovinos a nivel mundial son BVD e IBR. A su vez estos virus también son multisistémicos, y generan disfunciones en el sistema inmune, contribuyendo en gran parte al desarrollo de la enfermedad respiratoria más importante del ganado, el Complejo Respiratorio Bovino (CRB). En Uruguay no se han estimado las pérdidas que producen estas enfermedades en la ganadería nacional, sin embargo en países vecinos como Argentina, se ha estimado que se pierde un total de 812 millones de pesos (aproximadamente 64.500.000 dólares) a causa del impacto BVD más IBR en el rodeo nacional (Pacífico et al., 2013). Para controlarlas, existen diversas vacunas, y a pesar de que muchas de estas han demostrado ser eficaces a campo, en la práctica no suele tenerse en cuenta la presencia de BLV como enfermedad inmunosupresora/inmunomoduladora que puede disminuir la eficacia de la vacunación y por lo tanto la protección del rodeo. En Uruguay, BVDv y BoHV-1 están ampliamente difundidos en el rodeo lechero y se desconoce el real impacto sanitario que producen en rodeos infectados naturalmente. De acuerdo a estudios de prevalencia serológica llevados a cabo en determinadas zonas del país, la infección por BoHV-1 estaría ampliamente distribuida tanto en ganado de carne como lechero (Guarino et al., 2008; Mederos e Irigoyen, 1998; Saizar, 1997). En cuanto a la BVD, diversos estudios serológicos, tanto en ganado de carne como de leche, han estimado la prevalencia de la infección en el país entre un 97 al 100% en establecimientos y entre un 60 a 72% a nivel individual (Gil et al., 2000; Saizar y Gil, 1998). La vacunación para estos virus en el país no es obligatoria, pero se realiza desde hace varias décadas. Por todo lo anteriormente mencionado, el presente trabajo busca esclarecer si existe asociación entre la seropositividad frente a BLV en animales asintomáticos y la respuesta inmune disminuida de bovinos contra BVD e IBR.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

4.1.1 INTRODUCCIÓN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un *deltaretrovirus* oncogénico perteneciente a la familia *Retroviridae,* y es el agente causal de la Leucosis Bovina Enzoótica (EBL) (Aida et al., 2013; Kettmann et al., 1976). Este virus está estrechamente relacionado con el virus linfotrópico de células T humanas tipos I y II (HTLV-I y -II) y el virus linfotrópico de células T de simio (STLV) (Hajj et al., 2012; Tözsér, 2010). EBL es una enfermedad contagiosa y linfoproliferativa, caracterizada por linfosarcoma de células B, que se presenta en todo el mundo y que representa la enfermedad neoplásica más común del ganado lechero y de carne (Aida et al., 2013; Moratorio et al., 2013; Nekouei, Stryhn et al., 2015). A pesar de que el BLV puede infectar diferentes poblaciones de células inmunes en sangre periférica y tejido linfoide, principalmente afecta a linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M (IgM) en su superficie (Aida et al., 1993; Mirsky et al., 1996). La infección por BLV puede provocar varios cuadros clínicos. La mayoría de los bovinos infectados por BLV son portadores asintomáticos del virus (70%) y no muestran signos clínicos ni cambios en el recuento de linfocitos (infección subclínica) (Polat et al., 2017). Por lo tanto, existe una tasa de contagio extremadamente alta de BLV dentro de las poblaciones de ganado y su control se vuelve inviable (Juliarena et al., 2017). Alrededor del 30% del ganado infectado por BLV desarrolla linfocitosis persistente (PL), y alrededor del 1-5% pueden desarrollar tumores en forma de linfosarcoma maligno de células B después de un largo período de latencia (de uno a ocho años) (Pandey et al., 2017). El sistema inmunológico del ganado infectado se ve afectado incluso durante las etapas latentes de la enfermedad, y esto conduce a la incapacidad de los animales para mantener un rendimiento normal (Frie y Coussens, 2015). Por lo tanto, la infección por BLV tiene efectos negativos sobre la salud animal y productividad causando grandes pérdidas económicas en todo el mundo. El impacto económico es muy significativo en la industria lechera debido a las restricciones de movimiento, los costos de reposición, la reducción en en la producción de leche y la inmunosupresión que resulta en una mayor susceptibilidad a las enfermedades (EFSA AHAW Panel, 2015; OMSA, 2018).

4.1.2 GENOMA

BLV es un virus de ARN diploide monocatenario, cuyo genoma completo comprende un secuencia de 8714 nucleótidos (nt). El mismo contiene genes codificadores de enzimas y proteínas estructurales esenciales, y una región *pX*, flanqueada por dos repeticiones terminales largas (LTR) idénticas. Estos genes codificadores, llamados *gag, pro, pol* y *env*, tienen roles esenciales e indispensables en el ciclo de vida viral, infectividad viral y la producción de viriones infecciosos (Sagata et al., 1984).

El gen *gag* (group-associated antigen), es altamente conservado y consiste en una secuencia de 1178 nucleótidos que codifica el polipéptido precursor Pr44, que posteriormente se escinde en tres proteínas principales no glicosiladas (nucleocápside p12, cápside p24 y matriz p15) por la acción de la proteasa BLV (Katoh et al., 1991). La proteína de la matriz, p15, se une al ARN genómico viral e interactúa con la bicapa lipídica de la

membrana viral (Copeland et al., 1983); la proteína de la cápside, p24, es el principal objetivo de la respuesta inmune del huésped, con altos títulos de anticuerpos contra esta molécula que se encuentran en el suero de animales infectados (Willems et al., 1997); y la proteína de la nucleocápside, p12, se une al ARN genómico empaquetado (Katoh et al., 1993).

El gen *env* (envelope) está codificado por el polipéptido precursor gpr72, que se escinde en dos glicoproteínas, una proteína de superficie (SU), gp51, y una proteína transmembrana (TM), gp30 (Mamoun et al., 1990). Estas glicoproteínas juegan un papel importante en el ciclo de vida viral porque contienen el sitio de reconocimiento necesario para la entrada viral y median en la fusión celular (de Brogniez et al., 2015). El gen *en*v muestra un polimorfismo genético que es útil en estudios filogenéticos y clasificaciones de aislados de BLV, como lo confirman varios estudios (Rola-Łuszczak et al., 2021). La secuencia de nucleótidos y la composición de aminoácidos del gen *env* son marcadores genómicos útiles del BLV para la estudio de su distribución y revelar la presencia de diferentes genotipos que se correlacionan con origen geográfico (Licursi et al., 2003; Zhao & Buehring, 2007).

Dichos estudios se han centrado en particular el gen *env* gp51, debido a sus funciones biológicas. Además, debido a la localización superficial de esta, también es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes. Los epítopos conformacionales, F, G y H, ubicados en la mitad N-terminal de gp51, son importantes en la formación de sincitios y la infectividad viral (Portetelle et al., 1989). Por lo tanto, la región de secuencia *env* gp51 se utiliza con frecuencia para el análisis filogenético de BLV, detectándose al menos 11 genotipos de BLV.

El gen *pol* (polymerase) codifica las enzimas transcriptasa inversa e integrasa que son responsables de la transcripción inversa y la integración del ADN proviral del BLV en el genoma del huésped, lo que resulta en una infección de por vida (Lairmore, 2014).

La proteasa viral p14 (gen *pro*) está codificada por una región ubicada entre los genes *gag* y *pol*, y es responsable de la maduración postraduccional de BLV (Llames et al., 2001)

La región *pX*, que se encuentra entre *env* y 3'LTR, codifica las proteínas reguladoras Tax y Rex, y las proteínas accesorias R3 y G4. Las proteínas reguladoras son importantes para la regulación de la transcripción viral, la transformación de la leucemogénesis inducida por BLV y la exportación nuclear de ARN viral al citoplasma.

La proteína Tax actúa como un transactivador de la transcripción del provirus BLV y es oncogénica para las células huésped; provoca su transformación maligna por alteración del crecimiento celular e inhibición de la reparación del ADN (Lawson et al., 2018). También ejerce un impacto severo tanto en el estrés como en las respuestas inmunes (Arainga et al., 2012). Asimismo, el polimorfismo del gen *tax* es importante en la determinación del resultado de la infección por BLV ya que está relacionado con el diferente recuento de leucocitos en vacas infectadas con BLV; se ha descubierto que las variantes A y H de este gen se correlacionan con una disminución del recuento de leucocitos entre animales negativos y, por lo tanto, podrían ser el sello distintivo de la leucosis asintomática de la infección por BLV (Zyrianova & Kovalchuk, 2020).

Las proteínas accesorias R3 y G4 son clones moleculares del BLV infecciosos y tumorigénicos que contribuyen al mantenimiento de cargas virales elevadas, y su eliminación induce la pérdida del fenotipo leucemogénico del BLV (Willems et al., 1994)

La proteína Rex es un regulador post transcripcional de la expresión viral que se requiere para la síntesis de genes estructurales y es esencial para la infectividad en vivo (Camargos et al., 2004).

Además de los genes descritos anteriormente, el genoma del BLV también contiene microARN virales (miARN) codificados por la ARN polimerasa III entre las regiones *env* y *pX*.

Los miARN virales se expresan fuertemente en células preleucémicas y malignas, y pueden desempeñar funciones en la aparición y progresión del tumor a través de sus efectos sobre la carga proviral y, en consecuencia, la replicación viral en el huésped natural (de Brogniez et al., 2015). Los miARN del BLV no son esenciales para la infectividad, pero se ha demostrado que modifican algunos genes que están relacionados con otros mecanismos, como la apoptosis, la inmunidad, la señalización celular y la oncogénesis. Además, pueden expresarse tanto en bovinos que muestran signos de EBL como en animales asintomáticos infectados con leucosis (Gillet et al., 2016a).

4.1.3 PREVALENCIA

La primera descripción de EBL data del año 1871 en Lituania. Se creía que era una enfermedad infecciosa porque se propagaba a través de rebaños de ganado y se caracterizaba por la presencia de nódulos amarillentos de distintos tamaños presentes en el bazo agrandado (Leisering,1871). Pero fue recién en 1969 que BLV fue aislado de linfocitos cultivados de ganado bovino y fue identificado como el agente causal de la leucosis bovina (Schwartz & Lévy, 1994). Actualmente BLV se ha extendido a todos los continentes a través del comercio de animales reproductores y prevalece en el ganado bovino en todo el mundo. Sin embargo, los niveles de prevalencia de BLV varían entre y dentro de los países (Rodríguez et al., 2011).

4.1.3.1 Prevalencia mundial

Por ejemplo, un estudio epidemiológico de prevalencia de BLV en ganado lechero de Estados Unidos realizado por el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud Animal del Departamento de Agricultura demostró que el 83,9% del ganado lechero era BLV positivo a nivel de rebaño y el 39% de los rebaños de carne tenían al menos un al menos un animal infectado por BLV (United States Departament of Agriculture, 2007). Entre 2014 y 2015, Bauermann et al. (2017), demostraron que el 38,6% de los animales llevados a matadero eran positivos a BLV, siendo mayor en comparación la infección en bovinos de leche que de carne . Los datos más recientes han declarado que la tasa de prevalencia se encuentra elevada, llegando a un 40% (LaDronka et al., 2018). En Canadá, los estudios de prevalencia revelaron que hasta el 37,2% de las vacas y el 89% de los rebaños eran BLV positivos (Nekouei, 2015). En México se ha reportado que entre el 11% y el 66% del ganado lechero es portador de anticuerpos (Heinecke et al., 2017).

En contraste, varios países europeos comenzaron a establecer programas de erradicación del BLV y medidas de control a principios de los años 60; como resultado, Inglaterra, Francia, España, Alemania, Bélgica, Dinamarca, Suiza, Suecia, Polonia y muchos otros están oficialmente libres de BLV (Bartlett et al., 2014). Otros países, como Italia y Portugal, informan extensas localidades negativas para BLV, y la infección se restringe a áreas pequeñas (Juliarena et al., 2017).

En Australia y Nueva Zelanda, los programas nacionales de control y erradicación de BLV, fueron introducidos en 1983 y 1996, respectivamente. En diciembre de 2013, el 99,7% del ganado lechero australiano fue declarado libre de EBL, mientras que el de Nueva Zelanda ha estado libre desde 2008 (EFSA AHAW Panel, 2015)

En Japón, la EBL fue incluida como enfermedad de declaración obligatoria en 1998. Estudios epidemiológicos revelaron niveles variables de prevalencia del BLV en todo el país, según diferentes métodos de detección (Ohno et al., 2015), y tasas de infección por BLV del 40,9% del ganado lechero y del 28,7% del ganado de carne, con tasas de infección en

animales de más de 2 años de edad que alcanzan el 78% en rebaños lecheros y el 69% en rebaños de ganado de carne (Murakami et al., 2013). En China, se realizó un estudio de metanálisis para medir la prevalencia del BLV durante el período comprendido entre 1983 y 2019. Se registró una tasa de prevalencia agrupada del BLV del 10 % (4701 animales seropositivos de 34.954 animales) (Ma et al., 2021). Otro estudio señala que las tasas de infección alcanzan el 49,1% entre el ganado lechero individual, mientras que el 1,6% del ganado vacuno son BLV positivos (Yang et al., 2016). Además, las pruebas serológicas revelaron que el 20,1% de los yaks en China eran BLV positivos (J.-G. Ma et al., 2016). En países como Cambodia, Mongolia, y Taiwán las prevalencias son de alrededor de 5%.
También se ha registrado BLV en algunos países de Medio Oriente (Rodríguez et al., 2011), pero las infecciones son relativamente bajas. En Israel, la prevalencia es de aproximadamente 5% (Trainin and Brenner 2005), mientras que el 20,2% del ganado lechero de Arabia Saudita es BLV positivo (Hafez et al., 1990). En Egipto, se ha registrado serológicamente BLV en ganado lechero egipcio en un 15,83% y en un 20,8%, 9% y 0% en ganado de carne, búfalos y camellos, respectivamente (Zaher y Ahmed 2014). En comparación con estos países, las tasas de infección por BLV en Turquía son más altas: el 48,3% de los rebaños lecheros incluyen animales seropositivos (Burgu et al., 2005)
Más de 21 países afirman que han erradicado BLV, principalmente mediante el sacrificio o la segregación de todo el ganado que ha demostrado ser positivo mediante pruebas ELISA (EFSA AHAW Panel, 2017; Ruggiero & Bartlett, 2019)

4.1.3.2 Prevalencia en la región

En nuestra región, se han observado valores relativamente altos de prevalencia, y BLV está presente en la mayoría de los países. Se cree que la introducción del mismo se dió a través de la importación de bovinos infectados desde Europa y Estados Unidos (Carvalho et al., 1998). En Brasil, la prevalencia varía entre los diferentes estados, con rangos de infección que pueden llegar hasta un 60,8% (D'Angelino et al., 1998). La introducción del virus a este país se relaciona sobre todo con la importación de ganado de cría desde América del Norte y por la introducción masiva de animales desde Uruguay en los años 70 (Flores et al., 1992). En Argentina, la prevalencia individual y a nivel de rodeo es sumamente alta, de 77,4% y 90,9% respectivamente (Polat et al., 2016). Datos recientes de establecimientos que se ubican en las provincias de Córdoba, Santa Fé, Buenos Aires y Santiago del Estero, indican que de los animales en producción, un 80% en promedio, se encuentra infectado (Gutierrez y col., 2020). En Colombia, la prevalencia es de un 62% a nivel individual y de 92% a nivel de establecimiento (Corredor-Figueroa et al., 2020), mientras que en Chile, un estudio publicado por Grau y Monti (2010) describen prevalencias de 34,7%.

4.1.3.3 Prevalencia en Uruguay

En nuestro país, las primeras evidencias de EBL fueron descritas por Quiñones y Casas en el año 1963. Otro estudio realizado en 1996 demostró una prevalencia de la enfermedad del 20%, teniendo el 77% de los predios al menos un animal positivo (Mederos & Irigoyen, 1998). La seroprevalencia también varía entre los diferentes departamentos del país, ya que en un estudio realizado en 2003 se describió que en San José y Florida la seroprevalencia mediante ELISA fue de 77% y 72% respectivamente, mientras que en Colonia fue de 57% (Zaffaroni et al., 2007). A su vez, en el año 2009, en otros departamentos como Durazno, Florida y Tacuarembó, también se realizaron estudios de seroprevalencia mediante la técnica de Inmunodifusión en gel agar (AGID), teniendo como resultados un 9 % de animales seropositivos en Tacuarembó, 11% en Durazno, y 14 % en Florida (Furtado et al.

2013). Durante los años 2013-2014, un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo evidencia que la prevalencia de anticuerpos contra BLV en terneras de 8 meses era de un 45%, siendo estas provenientes de 29 productores del sur de Uruguay que ingresaban a un campo de recría lechero (Puentes et al., 2016). Más recientemente, Riet Correa et al., (2019), determinando la prevalencia de distintas enfermedades que afectan a los bovinos, concluyeron que la seroprevalencia de EBL fue de 65 % en tambos que tenían de 1 a 50 vacas, 77 % en tambos con 50 a 250 vacas, y 82 % en tambos con más de 250 vacas, con una prevalencia media de 78,8 %. Este aumento marcado de la prevalencia de BLV se puede explicar debido a la falta de programas de control y a la exigencia de la categoría "libre de LBE" para la exportación animal (Rama et al., 2010).

4.1.4 HUÉSPEDES

Generalmente, los retrovirus tienen una amplia gama de huéspedes que incluye ganado vacuno, búfalos, ovejas y cabras (Garcia-Etxebarria et al., 2014). Tres especies son huéspedes naturales de la infección por BLV: *Bos taurus* (ganado doméstico), *bos indicus* (cebú) y *bubalus bubalis* (búfalo) (Manaa et al., 2020). La enfermedad no está confirmada en algunas especies susceptibles, como los antílopes y no se ha detectado en otras especies de vida silvestre, como ciervos y llamas (en condiciones naturales), pero experimentalmente se han infectado ovejas, cabras, cerdos, pollos, ratas y conejos (Porta et al., 2019). En estos casos, la enfermedad tiene un período de latencia más corto, se apodera del animal más rápidamente y se transmite con mayor frecuencia que en el ganado vacuno.
La edad del ganado también juega un papel fundamental en la seroprevalencia de este virus, ya que estudios demuestran que las tasas de infección aumentan con la edad, siendo casi el doble en animales mayores de dos años en comparación con animales más jóvenes (Maezawa et al., 2018). Esto puede explicarse porque el riesgo de infección aumenta al pasar más tiempo en contacto con la enfermedad. Sin embargo, se han reportado casos de EBL en animales más jóvenes (Shaghayegh, 2019), sobre todo en rebaños que tienen mayor prevalencia de linfosarcoma (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Shaghayegh, 2019), por lo que no debe dejar de considerarse la infección independientemente de la edad.
Se estima que la heredabilidad de la EBL entre las poblaciones de ganado Holstein y Jersey es de aproximadamente 0,08%, lo que indica que la susceptibilidad genética desempeña un papel en la prevalencia del BLV en algunas razas de ganado (Abdalla et al., 2016). A su vez, estudios demostraron que BLV se transmite con mayor frecuencia entre el ganado lechero que entre el ganado de carne (Bauermann et al., 2017). Un estudio realizado en Japón informa que las tasas de seroprevalencia dentro del rebaño en el ganado lechero y de carne son del 40,9% y el 28,7%, respectivamente (Murakami et al., 2011). También en China se demostró que el 49,1% del ganado lechero y el 1,6% del ganado vacuno son positivos para el BLV (Yang et al., 2016). Esta asociación entre mayor prevalencia en ganado lechero sugiere que las prácticas de manejo juegan un rol importante en la transmisión del virus. Un estudio realizado en Brasil también revela que la posibilidad que tienen los animales de infectarse en un sistema de cría intensivo es 19,1% mayor que aquellos criados en un sistema extensivo (Santos et al., 2013).

4.1.5 TRANSMISIÓN

BLV existe en los linfocitos circulantes de la sangre periférica de los animales infectados, lo que hace que la enfermedad pueda transmitirse por medios tanto horizontales como verticales (Hutchinson et al., 2021). Las fuentes de infección son varias: sangre fresca, semen, saliva, leche, calostro, orina, heces y secreciones nasales. Todas estas contienen linfocitos infectados que cargan el ADN proviral de BLV, lo que permite que la transmisión sea de célula a célula (Camargos et al., 2004). Cabe recordar que, además de la vía de transmisión, las condiciones de manejo de los animales también es importante. En sistemas de manejo intensivo está muy implicado el contacto físico estrecho entre los animales y la participación del ser humano es muy importante, lo que lo relaciona directamente con la infección (Moratorio, 2012). Un ejemplo son los campos de recría, que facilitan la transmisión del virus en el rodeo (Puentes et al., 2017) lo que se explica debido al incremento de la densidad animal.

La transmisión horizontal, es la responsable de la mayoría de las infecciones, siendo los animales portadores asintomáticos la principal fuente de infección. Esta se da a través del traspaso de linfocitos infectados de un animal enfermo a uno sano, y como se mencionó anteriormente, se ve favorecida por el aumento de animales por metro cuadrado (Chamizo Pestana, 2005). Las rutas potenciales de transmisión incluyen todas las prácticas realizadas más allá del control de la transmisión sanguínea, siendo muy importante la infección iatrogénica durante la vacunación, la extracción de sangre, la castración, la inyección de medicamentos, el descorne, los tatuajes y la palpación rectal (Hopkins & DiGiacomo, 1997). Otro riesgo importante de diseminación horizontal del BLV lo plantean los insectos hematófagos, como los tábanos, la mosca de los cuernos (Haematobia irritans) y la mosca de los establos (Stomoxys calcitrans) (Buxton et al., 1985; Foil et al., 1988) , que pueden transportar el virus desde la sangre infectada de un animal huésped a otro susceptible durante la ingestión de sangre y supone un riesgo potencial de infección (Kohara et al., 2018). El papel crucial de las moscas que pican en la epidemiología y prevalencia del BLV ha sido identificado en diversos estudios pero bajo condiciones experimentales (Ooshiro et al., 2013; Panei et al., 2019). Sin embargo, su rol en condiciones naturales aún es discutido.

Algunas de las infecciones por BLV puede ocurrir verticalmente mediante la vía de transmisión materno-fetal (Andoh et al., 2020) o mediante la ingestión de calostro y leche que contiene provirus o partículas de virus libres. Dicha transmisión se ha correlacionado positivamente con las cargas provirales medidas en sangre periférica (Mekata et al., 2018).

Las células de la leche de vacas infectadas con BLV podrían causar infección ex vivo, lo que sugiere un riesgo potencial de la leche para la propagación vertical del BLV a través de la transmisión de célula a célula (Watanuki et al., 2019). Sin embargo, un título alto de anticuerpos en la leche y el calostro de madres con BLV positivo podría proteger contra la infección por BLV in vitro (Konishi et al., 2018), lo que hace que esta vía vertical sea inusual.

Por lo tanto, la carga proviral del BLV y el título de anticuerpos en la leche juegan un papel directo en la infección y protección de los terneros contra la enfermedad.

4.1.6 PATOGÉNESIS

BLV infecta células de la serie mononuclear, preferentemente linfocitos B CD5+, pero también se ha detectado en menor grado la presencia de ARN mensajero viral en monocitos, granulocitos y linfocitos T CD8+ (Schwartz et al., 1994). Los genes estructurales *pol* y *env* del BLV son esenciales para la infectividad in vivo y su eliminación elimina la

infectividad. Además, el polimorfismo del gen *env* conduce a un cambio en la patogenicidad viral (Park et al., 1994). Al igual que otros retrovirus, la estrategia replicativa de BLV consta de dos etapas; una temprana que depende de proteínas virales, y una tardía que depende de las enzimas del hospedero y de los productos de la expresión de genes virales (Moratorio, 2012). Durante la infección por BLV, una glicoproteína transmembrana de gp51 desestabiliza la membrana de la célula huésped con un péptido de fusión, después de lo cual las proteínas estructurales mejoran la fusión viral y la infectividad de las células huésped (Gatot et al., 2002). Después de la entrada del virus, no hay viremia detectable, pero sí una respuesta inmune humoral fuerte y persistente a las proteínas estructurales, especialmente contra *env* gp51 y la proteína central principal p24 (Camargos et al., 2007). Cuando el virus se encuentra en el citoplasma de la célula, ocurre la etapa de desnudamiento que antecede a la síntesis de ADN a partir del ARN viral. La síntesis de moléculas de ADN proviral del BLV se logra mediante la transcriptasa inversa. Luego, con la ayuda de la integrasa viral, el provirus se inserta en sitios aleatorios en el genoma del huésped una vez ingresado en el núcleo de las células infectadas (Tanaka & Komuro, 2005). Este proceso denominado integración viral marca el fin de la etapa temprana y el comienzo de la etapa tardía del ciclo replicativo, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN viral, proteínas y ensamblaje de la progenie (Moratorio, 2012). Entre 10 y 12 días post-infección, se puede identificar una viremia pasajera debida a la expresión génica y producción de viriones maduros en la célula hospedera (Schwartz et al., 1994). Luego la carga proviral disminuye significativamente debido a un agotamiento masivo de los clones producidos inicialmente por la respuesta inmune específica celular y humoral. Posteriormente, la propagación de la infección se da a partir de la expansión clonal de las células huésped infectadas, con ausencia de transcripción inversa (Juliarena et al., 2017). De este modo, la replicación viral y la infección de nuevas células ocurre durante un período corto de tiempo luego de la infección primaria. Sin embargo, el ciclo replicativo podría continuar de manera sostenida en el tiempo pero sin contribuir significativamente con la carga viral observada debido a una respuesta inmune eficiente (Gillet et al., 2007).
El provirus BLV permanece integrado en los genomas celulares de por vida, incluso en ausencia de anticuerpos BLV detectables, y la transcripción viral se bloquea durante el período latente de la enfermedad, lo que se denomina estado silencioso (Polat et al., 2014).

4.1.7 RESPUESTA INMUNE Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Generalmente, la leucosis bovina tiene dos formas: la primera es la forma fatal de EBL que se caracteriza por linfomas; la segunda es la leucosis bovina esporádica (SBL) que no es transmisible y principalmente afecta a terneros jóvenes (Gillet et al., 2007). La infección por BLV puede provocar una variedad de resultados clínicos (Aida et al., 2013), lo que permite dividir a la EBL en tres formas. La primera de ellas es la forma asintomática, siendo la presentación más frecuente (70%) y los animales infectados portadores asintomáticos del virus, es decir, serológicamente positivos sin linfocitosis ni ningún signo clínico (Juliarena et al., 2017). Esta forma se caracteriza por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados, lo que genera la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos virales (principalmente gp51), haciendo que sea una infección persistente, asintomática y aleucémica (Barez et al., 2015). Sin embargo, estudios revelaron que, a pesar de que los recuentos de linfocitos no estaban elevados, las células B CD5+ IgM+ sí estaban aumentadas (Panei et al., 2013), y existe evidencia sustancial que sugiere que el

ganado infectado con BLV pero clínicamente normal puede exhibir una grado de desregulación inmunológica que conduce a pérdidas económicas por diversas razones, incluyendo la reducción de la producción de leche (Nekouei et al., 2016), alta incidencia de enfermedades infecciosas (Sandev et al., 2004) e ineficiencia reproductiva (Bartlett et al., 2013).

Aproximadamente un tercio del ganado infectado (30%) desarrolla la segunda forma de presentación, denominada linfocitosis persistente (PL). Esta forma se caracteriza por una expansión policlonal no maligna de las células B CD5+ IgM+ que circulan en la sangre periférica, la mayoría de las cuales albergan el provirus BLV con alta carga viral (Polat et al., 2017). Esto se debe a una interrupción en la homeostasis de las células B, que representa un complejo equilibrio entre la tasa de proliferación y apoptosis de las mismas (Juliarena et al., 2017). Como consecuencia, los animales son serológicamente positivos, clínicamente normales (portadores asintomáticos) y positivos para PL, que se define como un aumento en el recuento de linfocitos superior a tres desvíos estándar sobre la media (International Committee on Bovine Leukosis, 1968) y a su vez, se mantiene en dos muestras analizadas separadas en el tiempo por un período de 60 a 90 días (Bendixen, 1963).

La forma final se presenta como la enfermedad tumoral propiamente dicha, es decir, linfosarcoma maligno (menos del 5%). Se origina por la acumulación mono o policlonal de células B CD5+ IgM+ tras un largo período de latencia que puede extenderse de uno a ocho años (Juliarena et al., 2017), por lo que se detecta con mayor frecuencia en bovinos de más de cuatro a cinco años que en animales más jóvenes (Ferrer et al., 1978; Schwartz & Lévy, 1994). Estas neoplasias malignas provocan una alteración del bazo y un notable agrandamiento de los ganglios linfáticos, que pueden ser visibles debajo de la piel. Las lesiones se pueden presentar como una masa tumoral blanca y firme o como un infiltrado tisular difuso. Las células neoplásicas con frecuencia pueden penetrar en el abomaso, la aurícula derecha del corazón, el intestino, el riñón, el pulmón, el hígado y el útero (Chamizo Pestana, 2005). Estas lesiones pueden causar varios trastornos funcionales de origen mecánico, como por ejemplo disnea (en el caso de compromiso de bronquios), meteorismo (en caso de compresión del esófago y del nervio vago), edemas (si hay compromiso cardíaco), parálisis de tren posterior (si hay compromiso de médula espinal) y exoftalmia (si compromete los ojos). Los signos clínicos de los tumores inducidos por BLV son variados e implican principalmente alteraciones digestivas, pérdida de peso, debilidad, reducción de la producción de leche, pérdida de apetito y agrandamiento de los ganglios linfáticos (OMSA, 2018).

4.1.7.1 Carga proviral

Podemos diferenciar a su vez, dentro de los animales hematológicamente normales, dos grupos de infección fenotípicamente diferentes de acuerdo a su carga proviral en sangre periférica y a título de anticuerpos, que se encuentran asociados al polimorfismo del gen MHCII BoLA-DRB-3 (Gutiérrez et al., 2017). Por un lado, tenemos los animales que desarrollan una alta carga proviral integrada al genoma (>100.000 copias provirales de BLV/µg de ADN) y títulos altos de anticuerpos anti gp51, y por el otro, están los animales cuya respuesta inmune es baja y su carga proviral generalmente alberga <100 copias provirales de BLV /µg de ADN, haciendo que generalmente sea indetectable por métodos moleculares utilizados habitualmente (Juliarena et al., 2007). La importancia de esta caracterización se hace evidente al momento de implementar los programas de control de la enfermedad, permitiendo seleccionar animales con bajas cargas para disminuir la presencia del virus en el rodeo (Juliarena et al., 2007).

Estudios recientes han comprobado que la introducción de animales con bajas cargas a rodeos libres de BLV y la segregación de aquellos con altos recuentos linfocitarios y altas cargas provirales disminuye el riesgo de incidencia de nuevas infecciones y la prevalencia general del rebaño, interrumpiendo la cadena de transmisión del virus (Juliarena et al., 2016; Ruggiero et al., 2019).

4.1.8 IMPACTO

En Uruguay no se ha calculado las pérdidas que produce la presencia de esta enfermedad. Sin embargo en Estados Unidos, donde BLV infecta a más del 40% de la población bovina (LaDronka et al., 2018), las pérdidas económicas anuales se han estimado en 525 millones de dólares sólo por la pérdida de leche (Ott et al., 2003; Ruggiero et al., 2019). Estas pérdidas económicas son a través de costos tanto directos como indirectos:
directamente porque se reduce la producción de leche, la enfermedad tiene un impacto extremo en la reproducción y algunas vacas mueren debido a la presentación tumoral (linfosarcoma) o deben ser sacrificadas prematuramente, e indirectamente porque están restringidas las importaciones de animales procedentes de zonas infectadas por BLV (Manaa et al., 2020; Norby et al., 2016) así como la exportación de ganado en pie, semen y embriones. Pero el mayor impacto del BLV se debe a la disminución de índices productivos y reproductivos, y a la alteración del sistema inmune. Por estas razones, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA ex OIE) ha incluido la EBL como una enfermedad que puede causar impactos drásticos en el comercio internacional (OMSA, 2018).
En cuanto a la respuesta inmune, el efecto más evidente de la infección es la linfocitosis en sangre periférica. Una revisión de 2015 realizada por Frie y Coussens (2015) describe varias de las respuestas inmunes alteradas reportadas en ganado infectado con BLV. Muchas de estas alteraciones inmunitarias tienen claras implicaciones negativas para la salud individual y del rebaño debido a enfermedades infecciosas, especialmente disminuciones asociadas al BLV en la inmunidad sistémica (IgG2, IgM), activación alterada de las células inmunitarias y proporciones alteradas de células T:B (Erskine et al., 2011; Frie et al., 2016, 2017) y una respuesta disminuida a la vacunación (Erskine et al., 2011; Puentes et al., 2016) como indicativo de una respuesta disminuida a los antígenos presentados de forma natural. La infección por BLV también se ha asociado con una disminución de la función de neutrófilos y monocitos, como una fagocitosis reducida y una apoptosis inhibida (Blagitz et al., 2017). Della Libera et al. informaron que los leucocitos de la leche (neutrófilos y linfocitos B) se ven afectados de manera similar, lo que genera preocupación sobre la inmunidad de la glándula mamaria (Della Libera et al., 2015). Los efectos de la infección por BLV sobre la inmunidad de las mucosas no están bien caracterizados a pesar de la importancia de la misma en la prevención de muchas enfermedades del ganado. El provirus BLV se ha detectado en una variedad de secreciones mucosas, incluidas la leche, la saliva, las secreciones nasales (Yuan et al., 2015), las secreciones vaginales y las heces (Ruggiero, 2019) lo que genera preocupación tanto por el riesgo de transmisión como por la función inmune. Un estudio reciente sobre un pequeño grupo de vacas, reporta que las concentraciones promedio de IgA total se mantuvieron sin cambios en el suero, pero fueron un 34% y un 24% más bajas en las muestras de leche y saliva, respectivamente, en las vacas que fueron positivas por ELISA, aunque ninguno de los resultados alcanzó significación estadística (Ruggiero, 2019). Por el contrario, las concentraciones promedio de IgM total no difirieron en la leche o la saliva, pero disminuyeron en el suero, como se ha observado en otros estudios.

A nivel reproductivo, existe una asociación entre el intervalo entre partos y el mayor número de servicios por concepción, lo que sugiere que el virus puede llegar a tener influencia en el comportamiento reproductivo del ganado lechero (Romero et al., 2015; Vanleeuwen et al., 2010). Un estudio reveló que las vacas seropositivas a BLV tuvieron un menor porcentaje de concepción en comparación con vacas seronegativas (Romero et al., 2015; Vanleeuwen et al., 2010). Nuestro grupo de trabajo también realizó un estudio comparativo donde la tasa de concepción fue 26% menor en vaquillonas seropositivas (Puentes et al., 2017)
También se menciona que la presencia del virus puede influir en la longevidad de los animales, teniendo un 40% más de probabilidad de ser refugadas aquellas vacas que tienen títulos de anticuerpos más elevados (Bartlett et al., 2013). De esta forma, los rebaños lecheros que tienen una alta prevalencia de la infección suelen presentar una edad media más baja. Esto impacta directamente en la producción láctea, ya que las vacas que tienen más probabilidad de ser infectadas son las vacas de mayor edad, y en comparación con las más jóvenes, son las que tienden a producir más leche (Bartlett et al., 2014).
Del mismo modo, se menciona que existe un efecto negativo en el nivel de producción y la calidad de la leche debido a BLV. En cuanto a nivel de producción de rodeo, estudios encontraron que hay una asociación lineal entre la mayor prevalencia de la infección y una menor producción láctea (Erskine et al., 2012; Ott et al., 2003). Individualmente, también se observó que la producción de leche disminuye 1.5%/vaca/año en animales infectados (Norby et al., 2016) y se estima una pérdida de 11.000 kg/animal en su vida productiva (Nekouei et al., 2016). Por otro lado, el aumento en el recuento de células somáticas (RCS) en leche también se ha asociado a la infección por BLV, especialmente en vacas con más de cuatro lactancias (Yang et al., 2016), lo que puede estar indicando mastitis clínica y subclínica y con ello una una reducción en la producción de leche, con porcentajes menores de grasa y caseína y mayor carga bacteriana, menor producción y calidad quesera y menor tiempo de conservación de los productos derivados (Gutiérrez et al., 2020).

4.1.9 POTENCIAL ZOONÓTICO

En cuanto a los riesgos para la salud pública de la leucosis bovina, no existe una determinación definitiva de cómo los humanos se infectan con el BLV o de sus efectos en las personas infectadas. La presencia de BLV o células infectadas por BLV en la leche de la mayoría de las vacas afectadas de forma natural sugiere que los humanos están frecuentemente expuestos al BLV por vía oral (Ferrer et al., 1981). También se ha encontrado ADN proviral del BLV en productos cárnicos, lo que ha centrado la atención en la posible transmisión de la enfermedad a los humanos a través de dichos alimentos (Olaya-Galán et al., 2017). Se han realizado diversas investigaciones epidemiológicas para determinar si BLV causa enfermedad en los humanos, sobre todo asociado al consumo de esta leche. Estudios realizados en Estados Unidos sobre casos de leucemia linfoblástica aguda infantil y linfoma no Hodgkin (Bender et al., 1988), e investigaciones de casos sobre leucemia humana y cáncer de pulmón en Corea (Lee et al., 2005), proporcionan evidencia adicional contra la participación del BLV en enfermedades humanas. A su vez, algunos estudios han revelado un vínculo entre el BLV y el cáncer de mama (Buehring et al., 2015, 2017; Giovanna et al., 2013), pero la evidencia sigue sin ser concluyente. Recientemente, se realizó la evaluación de 51 genomas completos de muestras de cáncer de mama para detectar la presencia de ADN BLV. Sin embargo, entre los 32 mil millones de lecturas de secuenciación, ninguna coincidió con cepas de BLV (Gillet & Willems, 2016). Debido a esto, actualmente BLV no es considerado peligroso para el ser humano (OMSA 2018), pero se

deben establecer políticas de prevención y control para disminuir la prevalencia viral y las tasas de transmisión entre las poblaciones de ganado y garantizar la ausencia de alimentos infectados en el mercado (Olaya-Galán et al., 2017).

4.1.10 DIAGNÓSTICO

Se han desarrollado una variedad de técnicas para el diagnóstico de BLV que se han implementado en todo el mundo. Estos métodos de diagnóstico se pueden dividir en dos grupos principales, que consisten en pruebas serológicas basadas en anticuerpos y la detección del genoma proviral mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en ácidos nucleicos. El ideal es que dichas técnicas sean de aplicación rutinaria y fácil detección. Esta es la razón por la que se utilizan ampliamente diferentes pruebas serológicas para detectar el BLV en animales. Sin embargo, aunque pueden proporcionar una detección rápida, son menos sensibles que otras técnicas existentes y no pueden adaptarse para pruebas de tejido o semen. Además, no proporcionan información sobre la carga proviral del BLV y el grado de progresión de la enfermedad inducida por el BLV (Jimba et al., 2012). Tampoco pueden usarse para detectar niveles bajos y transitorios de infección por BLV, para lo cual sí podría usarse una prueba de PCR por ejemplo.
Además de las técnicas mencionadas anteriormente, también se han descrito otros enfoques de diagnóstico del BLV, incluida la detección de proteínas virales mediante western blotting , un ensayo de formación de sincitios y la detección de antígenos del BLV mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (Aida et al., 1989; Inabe et al., 1998).

4.1.10.1 Pruebas serológicas

El objetivo de estas técnicas son los anticuerpos que reconocen la proteína de la cápside p24 codificada por el gen *gag* y la proteína gp51 extracelular codificada por *env-gp51*. Esto se debe a que los anticuerpos contra estas proteínas se producen poco después de la infección por BLV, pueden detectarse 2 a 3 semanas después de la infección y permanecen detectables durante toda la vida del animal (Jimba et al., 2012). Además, la proteína de la cápside p24 es un objetivo importante para las respuestas inmunes del huésped, induciendo títulos elevados de anticuerpos (Walker et al., 1987), y gp51 invoca la expresión de cantidades masivas de anticuerpos específicos en animales infectados (Portetelle et al., 1980). Entre las diferentes pruebas serológicas, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID) son las técnicas de referencia recomendadas por la OMSA para el diagnóstico de BLV. Aunque AGID es el estándar de oro, siendo relativamente económica y útil para examinar muchas muestras de suero simultáneamente, los ELISA se han utilizado con frecuencia debido a su mayor sensibilidad (Kuczewski et al., 2018). Además, en un estudio, la prueba AGID no logró detectar la infección en hasta el 30% de los animales que mediante otros métodos dieron positivo para BLV (Choi et al., 2002) y no logró detectar animales infectados por BLV a gran escala a partir de suero combinado o muestras de leche, mientras que algunos ELISA disponibles comercialmente han resultado eficaces en tales casos (Bai et al., 2018) con distintos grados de sensibilidad (entre 97% y 100%) y especificidad (entre 78% y 100%) (Kuczewski et al., 2018). ELISA es un procedimiento altamente sensible y de fácil implementación, y puede usarse para analizar muestras tanto de suero como de leche; sin embargo, requiere una serie de controles y puede dar resultados falsos negativos en muestras de suero en la fase temprana de la infección y resultados falsos positivos en terneros que contienen anticuerpos de origen materno (Burridge et al., 1982). Otras técnicas serológicas convencionales son el

ensayo de hemaglutinación pasiva (PHA) y el radioinmunoensayo (RIA). PHA tiene como objetivo detectar glicoproteínas de BLV, pero la eficacia de la prueba es sensible al pH, la temperatura y la tripsina. RIA es adecuado para diagnosticar BLV poco después de la exposición de los animales, pero no es adecuado para realizar pruebas de detección masivas (Nguyen & Maes, 1993).
En general, estos métodos de detección basados en anticuerpos no se pueden utilizar para realizar pruebas en terneros de menos de 6 meses de edad, debido a la presencia de anticuerpos maternos, que pueden generar resultados falsos positivos (Ohshima et al., 1984).

4.1.10.2 Detección de ADN proviral

BLV puede integrarse en sitios dispersos dentro del genoma del huésped y parece ser transcripcionalmente silencioso in vivo (Kettmann et al., 1979) y permanecer en los genomas celulares, incluso en ausencia de anticuerpos detectables contra el BLV. De hecho, la transcripción del genoma del BLV en muestras recientes de tumores o de células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados es casi indetectable mediante técnicas convencionales (Kettmann et al., 1982). Curiosamente, se puede detectar una copia del genoma proviral completo en ganado infectado con BLV durante el curso de la enfermedad (Tajima et al., 1998). Otro estudio también demostró que los tumores inducidos por BLV y las células infectadas por BLV contienen provirus, con aproximadamente cuatro copias de ADN proviral en cada tumor (Burny et al., 1988). Por lo tanto, además del diagnóstico rutinario de la infección por BLV utilizando las técnicas serológicas convencionales descritas anteriormente, los métodos de PCR basados en ácidos nucleicos pueden acelerar en gran medida la detección de la prevalencia del BLV.
En comparación con los ensayos serológicos, el desarrollo de técnicas moleculares más específicas y altamente sensibles, especialmente aquellas basadas en diferentes tipos de PCR, ha revolucionado el diagnóstico de BLV y otras enfermedades virales (Endoh et al., 2005). Es por eso que, la detección de ADN proviral de BLV es una herramienta útil para descubrir si el animal está infectado o no (Petersen et al., 2018).
Las pruebas de PCR pueden detectar directamente la presencia de ADN proviral en animales infectados con BLV que tengan títulos de anticuerpos bajos, transitorios o ausentes. Luego de realizado el PCR, la secuenciación y el análisis filogenético permiten el estudio de la distribución de los genotipos de BLV mundialmente. Además de esto, la PCR puede usarse para diferenciar los linfomas producidos por BLV de aquellos que son esporádicos (Lojkić et al., 2013). Sin embargo, puede fallar en detectar algunos casos que son seropositivos mediante ELISA debido a la cantidades extremadamente pequeñas de material genético proviral en los linfocitos de los animales infectados (Klintevall et al., 1994), infecciones confinadas a tejidos linfoides en lugar de linfocitos circulantes (Molloy et al., 1994) o la presencia de inhibidores de la ADN *taq* polimerasa en muestras de ADN (Petersen et al., 2018). Para la detección del BLV se han aplicado ampliamente en todo el mundo una variedad de métodos de PCR, incluida la PCR estándar, la PCR anidada o nested (nPCR), la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y la PCR directa en sangre (Polat et al., 2017). Dado que la carga proviral de BLV juega un papel importante tanto en el progreso como en el pronóstico de la enfermedad, la necesidad de algunas técnicas moleculares para cuantificar las copias virales en un animal infectado se volvió imperativa tanto en el diagnóstico como en las estrategias de erradicación de la leucosis bovina (Takeshima et al., 2016). Es importante destacar que el número de copias del provirus BLV es generalmente muy bajo en comparación con el de los genes del huésped, por lo que la

mayoría de los sistemas de PCR diseñados para detectar BLV utilizaron un diseño anidado (Tajima et al., 1998). Estos ensayos anidados son extremadamente sensibles, pero también obtienen resultados falsos positivos debido a la contaminación del ADN. Recientemente, se desarrolló un novedoso sistema de PCR basado en sangre que amplifica regiones diana del ADN sin necesidad de aislamiento y purificación del ADN (Takeshima et al., 2016). El ensayo puede detectar el provirus BLV con alta especificidad y a bajo costo, lo que facilita la identificación oportuna del ganado infectado con BLV. Una qPCR para BLV que se basa en la familia de colorantes SYBR es un método de confirmación que muestra una alta sensibilidad en la detección de la carga proviral de BLV en ganado infectado con niveles de anticuerpos bajos, transitorios o indetectables durante la etapa temprana de infección. Pero esta técnica tiene sus limitaciones, ya que requiere de un gen de referencia y tiene baja eficiencia en la presencia de matrices con inhibidores. Una PCR cuantitativa denominada qPCR de coordinación de motivos comunes del BLV (BLVCoCoMoqPCR) es otra técnica de diagnóstico altamente específica y sensible que se puede utilizar para detectar BLV en muestras que mostraron resultados negativos en pruebas de nPCR. Esta técnica también se puede utilizar para medir la carga proviral de BLV de variantes tanto conocidas como novedosas. Por lo tanto, puede utilizarse posteriormente para demostrar la correlación entre la carga proviral del BLV y la progresión de la enfermedad (Panei et al., 2013; Takeshima et al., 2015). Otra variante novedosa y altamente sensible es la droplet digital PCR (ddPCR), que ofrece una alternativa excelente para los programas de control de BLV. Sus ventajas incluyen la cuantificación del ADN sin necesidad de curvas de calibración, lo que permite la obtención de valores exactos más fácilmente (Rutsaert et al., 2018). También puede medir variaciones más pequeñas del número de copias en comparación con la qPCR (Whale et al., 2012) y puede determinar la cuantificación absoluta de muestras con mayor precisión, lo que hace que los resultados sean más confiables y reproducibles (Yurick et al., 2019). Esta técnica permite detectar pequeñas diferencias porcentuales y cuantificar variantes, una ventaja en comparación con las técnicas existentes para la detección y control de BLV, lo que la hace una herramienta prometedora para evaluar la carga proviral de BLV, sobretodo para detectar bajas cargas virales (De Brun et al., 2022).

4.1.11 CONTROL Y PREVENCIÓN

Al igual que con otras enfermedades virales, se requiere urgentemente un programa de vacunación para controlar la infección por BLV y existe una gran demanda de una vacuna contra la leucosis bovina. Sin embargo, las diferencias individuales en la sensibilidad a la enfermedad dificultan evaluar la eficacia de una vacuna candidata (Otsuki et al., 2015). A su vez, cabe destacar que una de las características que más dificultan la detección del virus por el sistema inmune, es la capacidad de este de mantenerse en estado silencioso dentro de las células infectadas. Por esto mismo, se ha intentado identificar compuestos que puedan revertir esta latencia y así permitir que el sistema inmunitario pueda actuar (Juliarena et al., 2017). Se han obtenido varios epítopos de gp51, gp30 y Tax, (proteínas que están muy implicadas en el desarrollo de la inmunidad celular) y que son particularmente beneficiosos para proporcionar un objetivo potente para la producción de anticuerpos monoclonales BLV, pudiendo facilitar en gran medida el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas para BLV (Bai et al., 2015). En una primera instancia, se desarrollaron vacunas de subunidades virales a partir de gp51. A pesar de que eran inmunogénicas, no fueron capaces de proteger en el desafío con el virus (Kabeya et al., 1996; Onuma et al., 1984). También se evaluaron vacunas inactivadas que se obtuvieron a

partir de células persistentemente infectadas, pero a pesar de producir una respuesta humoral relativamente fuerte, solo podían ofrecer protección a dosis bajas, ya que cuando se desafiaba a los animales con dosis altas estos se infectaban (Fukuyama et al., 1993; Miller & Van Der Maaten, 1978). Se han realizado estudios con lisados de células infectadas obteniendo vacunas capaces de ofrecer una protección parcial (Ristau et al., 1987), pero el riesgo de transmisión de enfermedades a partir de esta estrategia era algo a considerar (Gutiérrez et al., 2014a; Rodríguez et al., 2011). Otra alternativa, fue la utilización de péptidos sintéticos de gp51 para crear vacunas recombinantes, pero no han sido eficaces. Lo mismo sucede con las vacunas de ADN (Burny, 1996). Por último, se ha descrito la existencia de una vacuna exitosa que utiliza un provirus con múltiples modificaciones genéticas (Abdala et al., 2019; Gutiérrez et al., 2014; Rodríguez et al., 2011), pero de igual forma, no hay información suficiente sobre la evaluación de seguridad de la misma, ni de la protección inmunitaria que ofrece a largo plazo. Recientemente se ha producido una vacuna BLV mediante el uso de vacunas recombinantes transmitidas por el virus de la dermatosis nodular contagiosa (LSDV) contra BLV y LSDV, y se confirmó la expresión de los antígenos BLV *env* y *gag* de la vacuna recombinante (Suzuki, 2019).

A pesar de los avances en la investigación y los ensayos de vacunas contra BLV, todavía no existe una terapia eficaz ni una vacuna comercial disponible para el control de la EBL (OMSA, 2018), principalmente porque los ensayos muestran solo una estimulación incompleta o transitoria de la respuesta inmunitaria del huésped (Abdala et al., 2019). Es por esto que el control de la EBL se basa principalmente en el diagnóstico mediante pruebas serológicas y la implementación de medidas de manejo específicas.

Los programas para erradicar la infección por BLV se consideran un desafío mundial. Nunca se han considerado económicamente viables, especialmente cuando la prevalencia de la enfermedad es alta (Ruiz et al., 2018). Se han realizado varios intentos para controlar la infección por BLV y disminuir la frecuencia de la enfermedad en los rebaños, especialmente en vacas multíparas de 5 partos que viven en grandes explotaciones con más de 200 vacas, ya que se consideran entre los principales factores de riesgo (Selim et al., 2020). Por esto mismo, a la hora de elegir una estrategia de control hay que tener en cuenta la prevalencia de la infección en el rebaño, el valor de los animales y la posibilidad de recibir indemnizaciones por el sacrificio de animales seropositivos (Juliarena et al., 2017), costos económicos y restricciones de gestión (Rodríguez et al., 2011).

Se pueden seguir cuatro estrategias principales para prevenir la infección por BLV: prueba y sacrificio o segregación, selección genética, buenas prácticas de manejo y vacunación.

Varias regiones europeas donde la prevalencia del BLV es baja implementan con éxito una política para realizar pruebas a todos los animales y sacrificar aquellos que resultan positivos junto con una vigilancia continua para detectar evidencia de enfermedad (Ruggiero et al., 2019). Las regiones con altas tasas de prevalencia deberían reducir estas tasas hasta un punto en el que las pruebas y el sacrificio sean económicamente viables (Ruggiero et al., 2019), ya que esto va de la mano con el valor de los animales y su potencial genético y reproductivo. Esta estrategia implica el screening periódico mediante el uso de ELISA, PCR-DB y PCR en tiempo real, seguido de la segregación de todos los casos positivos y de los animales que presentan una carga proviral elevada (más de tres copias de BLV/100 células) a intervalos de varios meses o unos años (Nishimori et al., 2016). Además, el sacrificio de vacas mayores con recuentos elevados de linfocitos ayuda a controlar la infección por BLV y se considera el método de screening más económico, ya que evita la necesidad de realizar más pruebas (Nishiike et al., 2016). En el caso de sacrificio, al implicar políticas de compensación económicas, suele haber falta de adherencia a estos programas,

haciendo que los mismos fallen (Rodríguez et al., 2011). En cambio, cuando se habla de estrategias de segregación, la principal ventaja está en que no hay pérdidas por sacrificio prematuro ni reemplazos, y ha tenido resultados exitosos a pesar de su exigencia, llegando incluso a lograr la erradicación de la enfermedad (Rodríguez et al., 2011). Pero para que esta medida sea efectiva, hay que implementar el uso de áreas estrictamente separadas, así como equipos separados y desinfección cuidadosa de los materiales (Shettigara et al., 1989). La desventaja sin embargo, radica en que es un programa a largo plazo de aplicación y en el riesgo existente y permanente de introducir animales infectados.

La erradicación de la infección por BLV también puede lograrse a través de la selección genética de animales que portan genes de resistencia en sus moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII) (Bacon, 1987), porque se ha descubierto que el ganado con el alelo 0902 del gen MHCII BoLA-DRB-3 es resistente al BLV o muestra niveles significativamente bajos de carga proviral de BLV, por lo cual se propuso que el ganado que lo alberga podría no ser capaz de transmitir el BLV (Rodríguez et al., 2011). Sin embargo, esta estrategia podría tener inconvenientes críticos en cuanto a la susceptibilidad de los animales genéticamente seleccionados a otras enfermedades mortales en el futuro (Hayashi et al., 2017).

La prevalencia de la enfermedad también puede ser reducida mediante la aplicación de procedimientos de seguridad, como la introducción de un período de cuarentena adecuado cuando el ganado llega a una granja y pruebas serológicas junto con el uso de un sistema comercial cerrado que evite la introducción de animales de localidades infectadas. Es crucial centrarse en el movimiento de animales entre establecimientos (Notsu et al., 2020). Se recomiendan prácticas de manejo tradicionales para el control de la transmisión del BLV limitando la transferencia de células infectadas presentes en sangre, leche, secreciones y excreciones (Rodríguez et al., 2011). Estas incluyen: el uso único de jeringas, agujas hipodérmicas y guantes de tacto; uso de IA en lugar de reproducción natural (toros libres de BLV); control de población de moscas hematófagas; alimentación de terneros únicamente con calostro de vacas seronegativas, calostro pasteurizado en el caso de madres seropositivas o con reemplazos de calostro; limpieza y desinfección o esterilización de equipos contaminados con sangre que se reutilizan durante operaciones quirúrgicas, como castración, aplicación de caravanas en las orejas, tatuajes y descornados mediante el uso de cloroformo, éter y rayos UV; reposición con animales seronegativos y diagnóstico período (Silvera y Fraga, 2019). La aplicación de todas estas prácticas podría eventualmente reducir la prevalencia de ganado infectado con BLV a un nivel suficientemente bajo como para introducir una política de pruebas y sacrificio (Bartlett et al., 2020). Además, la propagación vertical de la enfermedad se puede evitar congelando y descongelando el calostro y la leche (a - 25 °C durante una noche) antes de alimentar a los terneros. Este sistema podría ser utilizado en el desarrollo de un programa eficaz de control del BLV (Kanno et al., 2014). La principal ventaja de esta estrategia en comparación con las mencionadas anteriormente, es que no requiere de mayores inversiones ni de la eliminación de los animales. Sin embargo, el cambio de rutina, el entrenamiento del personal, el factor humano y la existencia de otras fuentes de infección contribuyen negativamente. A su vez, los resultados probablemente no sean evidentes hasta luego de varios años (Puentes, 2016b).

En nuestro país, el apoyo del Estado respecto a la disponibilidad de una política de control de esta enfermedad está expresado en el Decreto 165/2007. Sin embargo, la creciente prevalencia de la enfermedad deja en evidencia que la implementación de medidas clásicas para el control de la infección, aunque efectivas, no fueron y no son ni sustentables ni

económicamente factibles para la mayoría de los productores lecheros (Silvera y Fraga, 2019) al igual que la falta de programas nacionales de control de la enfermedad.

4.2 RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA

4.2.1 INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus Bovino tipo I (BoHV-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Brown, 1989) y se conoce por producir una forma respiratoria grave de infección llamada Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) en animales de alta producción, Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) en vacas y Balanopostitis Pustular Infecciosa (IPB) en toros. Hasta el momento, todas las cepas aisladas pertenecen a una única especie viral que se clasifica en tres subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a y BoHV-1.2b (Metzler et al., 1985). Estos subtipos son relevantes ya que se asocian con diferentes manifestaciones clínicas (Engels & Ackermann, 1996; d'Offay et al., 2016). Afecta de forma natural a bovinos de todas las edades, provocando graves pérdidas económicas en el ganado (Nettleton & Russell, 2017; Sayers, 2017) ya que genera enfermedades respiratorias (rinotraqueítis, neumonía) y otras afecciones graves como vulvovaginitis, balanopostitis, conjuntivitis, lesiones genitales, trastornos reproductivos, abortos, encefalitis e infecciones generales (Miller et al., 1991; Roizmann et al., 1992). Al generar importantes pérdidas tanto por enfermedades como por restricciones comerciales en la industria ganadera (Bowland & Shewen, 2000), se desarrollaron rápidamente programas de control en función del nivel de seroprevalencia del BoHV-1, los cuales se basan en la detección y el sacrificio de animales seropositivos o en la vacunación repetida de los rebaños infectados (Ackermann & Engels, 2006)

4.2.2 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

El genoma del BoHV-1 está formado por una larga molécula de ADN lineal de doble cadena. Al ser un miembro de la familia *Herpesviridae*, la morfología de BoHV-1 se basa en una simetría de cápside icosaédrica, una envoltura que deriva células que contiene proteínas de membrana codificadas viralmente y un tegumento como matriz formada por proteínas que conecta la cápside y la envoltura. Como pertenece a la subfamilia de *Alphaherpesvirinae,* este virus presenta un ciclo de replicación relativamente corto, se disemina rápidamente en cultivos celulares y presenta alta citopatogenicidad, siendo una característica destacable el desarrollo de latencia en el organismo hospedador a nivel de ganglios nerviosos sensoriales y durante toda la vida del animal (Muylkens et al., 2007).

4.2.3 PREVALENCIA

BoHV-1 es un patógeno diseminado a nivel mundial que muestra diferencias significativas en la incidencia y prevalencia regional que puede ir desde 14 a 90% (Straub, 1990) con

respecto a las posiciones geográficas y el manejo de los animales en las regiones consideradas (Ackermann & Engels, 2006).

En la Unión Europea (UE) varios países o regiones se consideran libres de BoHV-1 tras la implementación de programas de erradicación (Commission European, 2004), incluidos Austria, Alemania, Dinamarca, Finlandia, Suecia y Jersey (Reino Unido), y el Valle de Aosta y la provincia de Bolzano (Italia) y, como tales, se les conceden garantías adicionales en materia de comercio. Las pruebas serológicas y la eliminación de animales infectados han eliminado el BoHV-1 de Dinamarca, Suiza y Austria (Ackermann & Engels, 2006). Otros países y regiones de la UE están aplicando actualmente programas de erradicación aprobados por la Comisión, entre ellos Bélgica, la República Checa, Luxemburgo y la provincia de Friuli-Venezia Giulia en Italia y también reciben garantías adicionales en términos comerciales (Commission European, 2017). En ambos casos, estas garantías adicionales impactan en el comercio de ganado vivo procedente de países o regiones no libres de BoHV-1, particularmente cuando no cuentan con programas de erradicación aprobados (Brock et al., 2020). En la República de Irlanda, se dispone de información sobre la prevalencia del BoHV-1 a partir de estudios transversales recientes (Barrett et al., 2018; Sayers et al., 2015). Estos estudios indican que el BoHV-1 es endémico, con un 75-90% de los rebaños irlandeses positivos para anticuerpos contra el BoHV-1. Se ha introducido la vacunación para reducir la prevalencia en los rebaños. Sin embargo, el uso legal de vacunas sin marcador cesó a finales de 2004. Desde entonces, el único tipo de vacuna autorizada en la República de Irlanda son las vacunas marcadoras, lo que permite diferenciar entre exposición al virus de campo y vacunación. Es por esto que las infecciones causadas por BoHV-1 en Europa presentan una prevalencia relativamente baja, que puede variar desde 35 a 54% (Furtado, 2016). En esta región los aislados del virus del subtipo 1 son frecuentes y se detectan en ganado que padece rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y en el tracto respiratorio de fetos abortados. Las cepas del subtipo 2b, también se aíslan con frecuencia en Europa y Australia (Edwards et al., 1990a), y se asocian con enfermedades respiratorias, IPB/IPV, pero no con abortos (D'Arce et al., 2002).

En comparación, América del Norte tiene índices de prevalencia más elevados, que oscilan entre 36 y 83%, ya que el carácter de la infección en esta región es endémico. BoHV-1 es la causa de aborto viral más frecuentemente diagnosticada en el ganado vacuno de esta región (Chase et al., 2017)

Lo mismo sucede en América del Sur, en países como Argentina, Colombia y Brasil, que han tenido variaciones de prevalencia entre 8,8 y 84,1%, demostrando el mismo carácter endémico de BoHV-1 (Furtado, 2016). Al igual que en Europa, en ambas regiones lo más frecuente es la detección del subtipo 2b, sin embargo, las cepas del subtipo 2a son prevalentes en Brasil y están asociadas con infecciones del tracto respiratorio y genital, incluida la IBR, la IPB, la IPV y los abortos (van Oirschot, 1995)

En nuestro país, BoHV-1 fue aislado por primera vez en el año 1981, mediante la utilización de un protocolo de inmunosupresión artificial con corticoides en un bovino seropositivo (Guarino et al., 1981). Años después, se volvió a aislar a partir de un bovino que presentaba un granuloma nasal (Rivero et al., 1987). En cuanto a la caracterización de los subtipos, el subtipo 1.1 (BoHV- 1.1) fue aislado en 1999 en un ternero que presentaba sintomatología nerviosa (Alonzo et al., 2002), mientras que el 1.2 fue aislado por Puentes et al. (2007) en los años 2002 y 2004. Esta enfermedad se encuentra distribuída ampliamente en nuestro país, ya sea en ganado de carne o de leche (Repiso et al., 2005). Estudios estimaron la prevalencia serológica a nivel nacional en un 37%. De todos modos, cabe destacar que del

99% de los establecimientos estudiados, existía al menos un animal positivo para BoHV-1, lo que demuestra la amplia difusión a nivel predial (Guarino et al., 2008).
Varios estudios han tenido como objetivo identificar los factores de riesgo de seropositividad para BoHV-1. Algunos de ellos están bien caracterizados, como los siguientes: edad, sexo (los machos son más frecuentemente positivos que las hembras) y tamaño del rebaño (Boelaert et al., 2005; Solis-Calderon et al., 2003). También se encontró que el contacto directo con animales, como la compra de ganado y la participación en exposiciones ganaderas, son factores de riesgo importantes para la introducción del BoHV-1(van Schaik, 2001; van Schaik et al., 2001). Otros factores, como la densidad de las granjas o la densidad del ganado, pueden aumentar el riesgo de introducción del BoHV-1(Vonk Noordegraaf et al., 2004).

4.2.4 TRANSMISIÓN

La puerta natural de entrada del BoHV-1 es la membrana mucosa del tracto respiratorio superior o genital. El virus se disemina mayoritariamente a través de secreciones respiratorias, genitales y oculares de animales infectados, tales como exudados nasales, gotitas expulsadas al toser, secreciones genitales, semen, fluidos y tejidos fetales. Los aerosoles contaminados por los materiales exhalados, estornudos y tosidos arrojados por los animales infectados ayudan en la transmisión de la enfermedad (Mars et al., 1999), estando demostrada la transmisión aérea por vía de aerosoles en distancias cortas (Mars et al., 2000). Es por esto, que el principal modo de transmisión que se produce entre el ganado infectado y el ganado susceptible es la infección por gotitas a través de la transmisión nasal directa (Muylkens et al., 2007). La transmisión venérea se convierte en el método de propagación de las enfermedades genitales, ya que puede transmitirse mediante el servicio natural y la inseminación artificial. La infección genital requiere contacto directo durante el apareamiento y también puede producirse a través de semen contaminado con virus (Kupferschmied et al., 1986). Nandi et al., (2009) informaron que BoHV-1 puede sobrevivir hasta 1 año en semen congelado en nitrógeno líquido, y debido a la criopreservación de la infectividad del virus, se requiere que los toros utilizados para la inseminación artificial estén libres de BoHV-1 (Tikoo et al., 1995). De lo contrario, el virus podría transmitirse a un gran número de vacas y provocar abortos espontáneos, infertilidad, endometritis y muerte embrionaria. Finalmente, la transmisión de BoHV-1 a través de la secreción vaginal y prenupcial es rara o menor. Estudios también han establecido que este virus se puede transmitir a través de vectores mecánicos (Straub, 1991).

4.2.5 PATOGÉNESIS

Después de la infección inicial, 2-3 días después de la exposición los animales desarrollan fiebre con el consiguiente aumento de la frecuencia respiratoria e inapetencia, y en el ganado lechero hay una caída precipitada en la producción de leche (Tikoo et al., 1995)
En animales mayores de 3 meses, la replicación del virus generalmente se limita a las superficies mucosas del tracto respiratorio y la recuperación ocurre dentro de 10 a 12 días. Sin embargo, si se establece una infección bacteriana secundaria, la interacción produce neumonía grave (Yates, 1982). En terneros jóvenes (<5 días de edad) BoHV-1 causa lesiones mucho más graves que en terneros mayores (Mechor et al., 1987).

Se puede decir que la infección pasa por tres fases: una primaria, que dura aproximadamente 2 semanas; una secundaria que se denomina fase de latencia, que puede durar por el resto de la vida; y la última, de reactivación del virus latente y posterior liberación (Muylkens et al., 2007). Durante la etapa aguda de la infección, el virus se replica en el sitio principal de entrada, generalmente la mucosa respiratoria o genital, seguida de la infección de las terminaciones nerviosas sensoriales (Winkler et al., 1999). Luego, BoHV-1 se transporta mediante flujo axonal retrógrado a los ganglios (trigémino, sacro, lumbar o torácico) o las amígdalas, donde permanece en forma latente, lo que hace que sea difícil de detectar (Ackermann & Wyler, 1984) y deja al animal en un estado de portador permanente. Como se ha informado para otras enfermedades causadas por herpesvirus en el hombre y los animales, el ciclo de reactivación latente tiene un profundo impacto epidemiológico ya que es responsable del mantenimiento del BoHV-1 en una población bovina.

4.2.5.1 Latencia de BoHV-1

El ganado con infección latente sirve como portador y puede infectar a otro ganado susceptible (Thiry et al., 1987), dificultando cualquier programa de control. La infección de bovinos con estado inmunológico comprometido causada por portadores latentes sometidos a estímulos de reactivación (estresantes) puede ocurrir en varias ocasiones, como por ejemplo en el nacimiento (Thiry et al., 1985), el apareamiento, durante el transporte (Thiry et al., 1987) o después de la introducción de nuevos animales en el rodeo. Esto hace que la detección de portadores latentes del BoHV-1 sea una preocupación a la hora de establecer un programa de control del BoHV-1. La identificación de animales con infección latente se basa habitualmente en la detección de anticuerpos específicos del BoHV-1. Sin embargo, la inmunidad calostral adquirida pasivamente puede interferir con una respuesta activa de anticuerpos después de la infección (Bradshaw & Edwards, 1996; Lemaire et al., 2000a). Como consecuencia, un estudio demostró que se obtuvo un portador latente seronegativo del BoHV-1 (SNLC) 7 meses después de la infección experimental de terneros inmunizados pasivamente con un BoHV-1 virulento (Lemaire et al., 2000b).

4.2.6 RESPUESTA INMUNE

El ganado con infección aguda por BoHV-1 desarrolla primero una respuesta inmune innata (Babiuk et al., 1985; Jensen & Schultz, 1990; Lawman et al., 1987). Algunos de los mecanismos involucrados en esta respuesta son la activación del complemento y la producción de citoquinas (Muylkens et al., 2007). Estas últimas son las encargadas de iniciar el reclutamiento y activación de diferentes células de la línea blanca, y potencian la primera onda antiviral (Campos et al., 1989). A pesar de esto, se produce una replicación y propagación eficiente del virus. Es así, que a partir del quinto día post infección, la inmunidad celular específica comienza a hacer su aparición, alcanzando su máximo a los 7-10 días, que generalmente coincide con la recuperación de las manifestaciones clínicas (Babiuk et al., 1996). Dentro de esta etapa, los linfocitos T CD4+ específicos median la lisis de células infectadas, activando macrófagos y células NK a través de la secreción de IFNγ e IL2, y reclutando y promoviendo la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos (Muylkens et al., 2007). En consecuencia, a partir del décimo día la inmunidad humoral específica se vuelve detectable, generando anticuerpos neutralizantes que reconocen las glicoproteínas de la envoltura, incluidas gB, gC, gD y gH (Marshall et al., 1988). Las primeras inmunoglobulinas que aparecen son las IgM, seguidas por las IgG (IgG1 en respuesta primaria e IgG2 en respuesta secundaria) (Guy & Potgieter, 1985; Romera, 2001).

La IgA se encuentra restringida a nivel local en el tracto respiratorio superior en el caso de IBR, siendo los mecanismos celulares los que predominan en el tracto aéreo inferior.
En cuanto a esto, un estudio demostró que en efecto, luego de la infección aguda primaria debido a BoHV-1, se desarrolla una respuesta humoral en la que primeramente los niveles de IgM y de IgA aumentan entre los 2 y 14 días post-inoculación, seguidos de IgG1 entre los días 11 y 30 e IgG2 luego del día 30 (Spilki et al., 2012). A pesar de que el papel de los anticuerpos en cuanto a la prevención de la diseminación es cuestionable ya que el virus puede escapar de estos, tiene gran importancia en prevenir infecciones secundarias y limitar las consecuencias de la reactivación viral (Babiuk et al., 1996). Además, la inmunidad pasiva proporcionada por los anticuerpos calostrales de las vacas inmunes al BoHV-1 es totalmente eficaz para proteger al recién nacido contra cuadros sistémicos y letales (Mechor et al., 1987). Sin embargo, aunque la respuesta inmune del huésped puede eliminar el virus después de una infección aguda, la infección viral afecta el reconocimiento inmunológico en varios niveles como son la inmunidad mediada por células (Griebel et al., 1987, 1990), el reconocimiento de células T CD8+ de las células infectadas (Nataraj et al., 1997), el funcionamiento de las células T CD4+ porque el BoHV-1 las infecta e induce rápidamente la apoptosis después de la entrada viral (Winkler et al., 1999), y las respuestas al interferón (Jones, 2009). Entonces, debido a que el ganado infectado por BoHV-1 nunca puede eliminar la infección y debido a que todas las infecciones primarias por BoHV-1 conducen a una infección latente de por vida, se especula que estas estrategias de evasión inmune podrían desempeñar un papel para facilitar que BoHV-1 establezca una infección persistente (Muylkens et al., 2007).

4.2.7 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Como se mencionó anteriormente, el BoHV-1 causa una gran variedad de manifestaciones clínicas. La gravedad de los signos clínicos puede variar desde subclínicos hasta fatales y los resultados dependen de factores virales, como la virulencia de la cepa BoHV-1 (Kaashoek et al., 1996), factores de resistencia del huésped, especialmente la edad, factores ambientales y posibles infecciones bacterianas concurrentes. Las infecciones subclínicas por BoHV-1 son comunes. Varias cepas de BoHV-1 clasificadas como débilmente virulentas muestran una capacidad deficiente para inducir signos clínicos (Kaashoek et al., 1996). De otro modo, estos cuadros clínicos discretos también pueden explicarse por la infección primaria de terneros pasivamente inmunes en países donde el BoHV-1 es endémico. De hecho, se sabe que la inmunidad calostral protege eficazmente a los animales infectados de los signos clínicos (Lemaire et al., 2000b; Mechor et al., 1987). Aunque la mayoría de las cepas de BoHV-1.1 se han aislado de enfermedades del tracto respiratorio o casos de aborto y las cepas de BoHV-1.2 de lesiones de órganos genitales, el único criterio distintivo confiable es el análisis del ADN viral (Engels et al., 1981; Miller et al., 1991). De hecho, un estudio demuestra que los terneros infectados experimentalmente por vía nasal con cepas BoHV-1.2 mostraron signos clínicos respiratorios y pudieron transmitir la infección respiratoria a los terneros de control (Edwards et al., 1991). De otro modo, se observaron lesiones del tracto reproductivo en vaquillonas después de la inoculación intrauterina con BoHV-1.1 (Miller & van der Maaten, 1984). Mientras que los subtipos 1.1 y 1.2a clínicamente pueden cursar con síntomas respiratorios y se han asociado con enfermedades graves, incluidas la infección del feto y el aborto (Miller et al., 1991), el

subtipo 1.2b está asociado a la enfermedad genital (IPV/IPB) pero no al aborto (Edwards et al., 1990b; Whetstone & Miller, 1989).
En cuanto a la forma respiratoria, los signos aparecen de 2 a 3 días de incubación. Estos son consistentes con la respuesta inflamatoria y el daño epitelial que genera BoHV-1 en los sitios primarios de replicación, generando una obstrucción de las vías aéreas superiores. Se puede observar la mucosa nasal hiperémica, secreción nasal que puede ir de serosa a mucopurulenta, lesiones necróticas a nivel de morro y mucosa, y en casos graves, respiración dificultosa al inspirar (estridor causado por restos necróticos en la luz traqueal) y tos. También pueden observarse signos oculares como conjuntivitis y secreción ocular mucopurulenta. A su vez, también se sabe que este virus genera inmunosupresión transitoria, lo que, junto con el daño a la mucosa respiratoria, hace que sea un patógeno importante en la enfermedad del complejo respiratorio bovino, la enfermedad respiratoria más importante en ganado (Jones, 2019). Esta forma clínica generalmente es acompañada por otros signos generales, tales como fiebre, depresión, inapetencia, reducción de la producción de leche, infertilidad y aborto (Repiso et al., 2005). Esta asociación responde a una viremia inicial y pasaje del virus hacia la sangre (Repiso et al., 2005).
En cuanto a la forma reproductiva, su principal impacto se ve reflejado en la repetición de celos, la mortalidad embrionaria y fetal, y el aborto. Además es causante de infecciones genitales que culminan en vulvovaginitis y cervicitis (Barbosa et al., 2019).
En cuanto al aborto, BoHV-1 es considerado el principal agente viral causante del mismo a nivel mundial (Muylkens et al., 2007), haciendo que sea uno de los patógenos virales más importantes para el ganado bovino. Como se mencionó anteriormente, ell aborto es consecuencia de una infección respiratoria por BoHV-1 de una vaca seronegativa, y suele presentarse luego de una primoinfección con o sin sintomatología aparente. Generalmente ocurre a las pocas semanas de la exposición al virus, pero si hace latencia en la placenta puede demorarse hasta 3 o 4 meses post exposición (Radostits, 2007). Se considera que los abortos son tardíos, ya que se observan entre los 4 y 8 meses de gestación (la mayoría luego de los 7 meses), aunque está demostrado que la inoculación parenteral experimental del virus en vaquillonas antes de los 3 meses induce la muerte embrionaria (Miller & Van der Maaten, 1986). Por otra parte, las infecciones genitales tales como IPV e IPB son de naturaleza local y se caracterizan por no dejar secuelas. Se pueden observar lesiones necróticas presentes en la mucosa vaginal o prepucial, que pueden variar de leves a severas, y formación de pústulas redondeadas cuya evolución es favorable en la mayoría de los casos (Repiso et al., 2005).
En resumen, si bien BoHV-1 es importante por las enfermedades respiratorias que genera, las implicancias a nivel reproductivo son las más relevantes en la producción (Newcomer et al., 2017b).

4.2.8 DIAGNÓSTICO

A partir de hallazgos clínicos, epidemiológicos y anatomopatológicos se puede sospechar de una infección por BoHV-1. Sin embargo, es necesario recurrir a pruebas de laboratorio, tanto serológicas y de aislamiento viral, como moleculares, para poder confirmar el diagnóstico definitivo. En cuanto a los métodos serológicos, estos suelen utilizarse para detectar anticuerpos en el suero, siendo alguno de ellos la Seroneutralización in vitro (Bitsch, 1978) y distintos ELISA (Kramps et al., 1993). Otra técnica para el diagnóstico es el aislamiento del virus y la identificación del efecto citopático. Para esto, se utilizan distintos cultivos celulares de origen bovino, como células pulmonares o renales secundarias o la línea de células

renales bovinas Madin-Darby (MDBK) y se observa el efecto citopático producido por el virus en aproximadamente 2-4 días (OMSA, 2017). A su vez, también pueden realizarse técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y moleculares, como la PCR, para el procesamiento de muestras tales como hisopados (nasales o genitales) tomados durante la fase aguda de la infección, o muestras de órganos (OMSA, 2017).
Como se mencionó anteriormente, esta enfermedad es altamente prevalente en los rodeos de nuestro país, por lo que un resultado serológico aislado solamente determina que el animal estuvo en contacto con el virus en algún momento de su vida. Si se quisiera llegar a un diagnóstico definitivo del estatus de ese animal, lo que se necesita es un estudio de muestras pareadas y/o la detección del virus (Repiso et al., 2005).
Otro problema que se presenta a la hora de conocer la situación real de la enfermedad, es que los métodos serológicos tienen la desventaja de no poder diferenciar animales vacunados de aquellos infectados naturalmente (Furtado, 2016)

4.2.9 CONTROL Y PREVENCIÓN

Los objetivos de controlar la infección por BoHV-1 han evolucionado a lo largo de las últimas décadas desde una reducción de una reducción fácilmente obtenida del impacto clínico hacia una prevención más difícil de la transmisión del virus (Muylkens et al., 2007)
Para esto se han descrito varios métodos, teniendo en cuenta la prevalencia serológica existente. En países o regiones con baja prevalencia, la erradicación es viable eliminando los animales seropositivos (Ackermann & Engels, 2006). Por el contrario, en los países donde la prevalencia es alta, la erradicación se hace más difícil y la enfermedad debe ser controlada ya sea con la utilización de vacunas, el uso de toros no portadores del virus y medidas de manejo que ayuden a prevenir el estrés y la transmisión del agente (Alonso, 2010). En cuanto a las vacunas BoHV-1, estas pueden clasificarse en cuatro categorías: vacunas vivas modificadas, inertes (inactivadas y subunitarias), de ADN y basadas en vectores. Hasta el momento, la mayoría de las vacunas desarrolladas reducen los síntomas clínicos, la replicación viral y la transmisión a nivel de campo, pero no evitan la infección ni el establecimiento de latencia. (Alonso, 2010). Estudios realizados en la región, compararon la respuesta generada por distintas vacunas comerciales, estableciendo que los títulos neutralizantes fueron aceptables (Anziliero et al., 2015). Más recientemente, se supo que la vacunación, ya sea con vacunas vivas o inactivadas disminuye el riesgo de aborto en un 60%, lo que confirma el beneficio de incluír este método para los programas de control (Newcomer, 2017b). En nuestro país se permite únicamente el uso de vacunas inactivadas aprobadas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a partir del año 1996. Sin embargo, no son vacunas obligatorias, ya que comercialmente no existen restricciones para la exportación de ganado seropositivo. Por lo tanto se utilizan como prevención o en establecimientos donde existen repercusiones productivas generadas por este virus. Recientemente, un estudio llevado a cabo por De Brun et al. (2022) evaluó el rendimiento de cuatro vacunas comerciales disponibles contra el BoHV-1 comúnmente utilizadas en América Central y del Sur. En el ensayo se evaluaron anticuerpos neutralizantes y específicos de isotipo (IgG1 e IgG2). Como resultado, solo una de las vacunas indujo niveles significativos y detectables de anticuerpos neutralizantes contra el BoHV-1. Esa vacuna fue utilizada para esta tesis. Sin embargo, hasta el momento no existen en nuestro país estudios que midan la respuesta inmune generada por las vacunas que se utilizan relacionándolo con el estado serológico para BLV.

4.3 DIARREA VIRAL BOVINA

4.3.1 INTRODUCCIÓN

La diarrea viral bovina es una importante enfermedad infecciosa de producción presente en la mayoría de los países productores de ganado (Moennig et al., 2005) causada por el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), uno de los virus más importantes que afectan a la especie bovina en mundialmente (Chang et al., 2021; Scharnböck et al., 2018). El BVDV es un virus ARN que pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Smith et al., 2017) y como se mencionó anteriormente tiene amplia distribución mundial (Ridpath et al., 2010; Yeşilbağ et al., 2017). Las infecciones por BVDV tienen un impacto económico global, ya sea con pérdidas directas debido a altas tasas de morbilidad y mortalidad, retraso del crecimiento, disminución de la fertilidad y la producción láctea, un aumento del sacrificio prematuro y una disminución del rendimiento reproductivo (Burgstaller et al., 2016; Richter et al., 2017), o indirectas, como el gasto sustancial necesario para controlar las infecciones por BVDV (Pinior et al., 2017). Esto es resultado de una combinación compleja de dos cepas del virus que inducen diversos síndromes clínicos en los animales afectados (Lanyon et al., 2014). A su vez, se sabe que este virus causa inmunosupresión debido a su tropismo por las células del sistema inmune, lo que exacerba el impacto de las coinfecciones (Chase, 2013), lo que se asocia no solo con un incremento en la severidad de infecciones respiratorias, entéricas y reproductivas, si no también con el rendimiento de las vacunas (Byrne et al., 2017). Desde hace mucho tiempo se han utilizado vacunas vivas atenuadas e inactivadas para la inmunización de los animales (Newcomer et al., 2017a). Sin embargo, la aparición de nuevas cepas y variantes también ha obstaculizado la eficacia de las mismas, por lo que son necesarias nuevas vacunas que coincidan con las cepas circulantes para generar un impacto en los esfuerzos de lucha contra BVDV (Al-Kubati et al., 2021)

4.3.2 GENOMA

Las partículas de BVDV tienen forma esférica o semiesférica y está envuelta por una capa bilipídica externa (Callens et al., 2016). Existe cierta variación en el tamaño de las partículas de virus con un diámetro de aproximadamente 50 nm (rango entre 40 y 60 nm) (Wegelt et al., 2011). Este virus se clasifica a partir del genotipado y serotipado (Bauermann et al., 2013). Se han identificado dos genotipos de BVDV en función de su citopatología y su capacidad de crecimiento en cultivos celulares (BVDV-1 y BVDV-2). Sin embargo, el Pestivirus H o tipo HoBi fue identificado recientemente en Europa a partir de sueros fetales bovinos importados de Brasil (Bauermann et al., 2013). Este virus fue potencialmente clasificado como uno de los pestivirus atípicos o pertenece a los serotipos BVDV-3 (Bauermann et al., 2013). Según la secuenciación parcial o completa del genoma, BVDV-1 se ha clasificado en al menos 22 subtipos (BVDV-1a a BVDV-1v) (Oğuzoğlu et al., 2019), mientras que BVDV-2 y el virus tipo HoBi se dividieron en 4 subtipos (a, b, c y d) (Mishra & Kalaiyarasu, 2019). Múltiples especies y genotipos conducen a la mutación del BVDV, lo que plantea grandes obstáculos para su prevención y control. A su vez, existen dos biotipos conocidos dentro de cada genotipo del virus: se puede dividir en tipo citopático (CP) y tipo no citopático (NCP) según cause cambios patológicos en células de tejido cultivadas (Meyers & Thiel, 1996). NCP BVDV puede infectar a las vacas en las primeras etapas del

desarrollo embrionario y producir terneros persistentemente infectados (PI), lo que dificulta el control del BVDV, siendo la principal fuente de infección porque es inmune tolerante a las cepas infectadas, no produce anticuerpos y está siempre infectado (Peterhans et al., 2003)

4.3.3 PREVALENCIA

El BVDV se identificó por primera vez en los EE. UU. en un rebaño de ganado que padecía gastroenteritis aguda con altas tasas de mortalidad (Olafson et al., 1946). Desde entonces, este virus representa uno de los principales patógenos virales de ganado vacuno en varias regiones del mundo (Al-Khaliyfa et al., 2010; Grooms, 2004) con diferentes prevalencias de genotipos según la región geográfica (Yeşilbağ et al., 2017). Estas variaciones están influenciadas por una variedad de factores, incluidos los sistemas agrícolas y las opciones de control en diferentes áreas (Zirra-Shallangwa et al., 2022).
En nuestra región, se han demostrado infecciones por el BVDV-1 y BVDV-2 (Odeón et al., 2009; Ståhl et al., 2009; Weber et al., 2014), mientras que hasta el momento, el virus tipo HoBi solo se ha identificado en Argentina (Pecora et al., 2017) y Brasil (Dias et al., 2017).
La primera evidencia de la circulación de BVDV en Uruguay data del año 1996 (Saizar, 1998). A partir de ese momento, se fueron realizando estudios de seroprevalencia que indicaron la presencia del virus en el 100% de los establecimientos estudiados.
Desde entonces los estudios de seroprevalencia de esta enfermedad en los rodeos entre los años 1998-2008 muestran la presencia del virus en el 100% de los establecimientos estudiados (Guarino et al., 2008; Repiso et al., 2005). Recientemente, un estudio realizado por Maya et al. (2016) (Maya et al., 2016) determinó que los sub genotipos circulantes en el país son predominantemente el BVDV-1a, seguido de BVDV-1i y BVDV-2b.

4.3.4 TRANSMISIÓN

BVDV puede transmitirse tanto de forma horizontal como vertical. La transmisión horizontal se da tanto de forma directa como indirecta por inhalación o ingestión de materiales contaminados con el virus (Lindberg, 2003). Los mecanismos comunes de transmisión horizontal pueden ser fómites (alimento, agua y equipos), a través de palpaciones (si se usa el mismo par de guantes para todos los exámenes), secreciones y excreciones (orina, heces, moco, leche), el hacinamiento (también puede aumentar la transmisión si los animales están infectados con el tipo respiratorio del BVDV) y los vectores (tábanos, moscas del establo, moscas de la cabeza, moscas de la cara) también han demostrado transmitir el BVDV (Lindberg & Houe, 2005). En cuanto a la forma vertical, esta desempeña un papel importante en la epidemiología y patogenia de la enfermedad. El virus puede transmitirse de forma venérea a través de semen de toros infectados o bien por transferencia de embriones (Guarino et al., 2008). Los toros infectados pueden eliminar BVDV en el semen durante períodos prolongados, siendo también infeccioso incluso luego del proceso de congelación (Bielanski et al., 2009; Givens et al., 2003). El virus también tiene la capacidad de causar infección transplacentaria dando lugar a diferentes resultados dependiendo de la etapa de la gestación en la que se produce la infección aguda, lo que lleva a muerte fetal, malformaciones, síndromes agudos del recién nacido, tolerancia inmune y persistencia viral de por vida (Peterhans et al., 2003). La producción de terneros persistentemente infectados (PI) es resultado de la transmisión transplacentaria durante el primer tercio de la gestación. Estos animales son importantes ya que son los principales encargados del mantenimiento y

diseminación del virus en los rodeos, a través de la eliminación de grandes cantidades de virus a lo largo de sus vidas (Houe, 1995).

4.3.5 PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección con BVDV puede derivar en diferentes tipos de manifestaciones clínicas.
Por un lado, podemos tener una infección transitoria (IT) que deriva en BVD clásica. En este caso, generalmente el virus tiene acceso a la mucosa orofaringea por ingestión o inhalación, y, tras el contacto con la misma, la replicación inicial comienza en las células epiteliales, con una predilección por las amígdalas. Los virus recién ensamblados salen por exocitosis y se diseminan sistemáticamente por el torrente sanguíneo, ya sea a través del virus libre o a través de leucocitos infectados por virus. En el caso de los machos, el BVDV se replica en las vesículas seminales y en la próstata. El resultado de la IT y la viremia resultante está relacionado con varios factores, incluido el genotipo y la virulencia del virus, la edad, el estado inmunológico y fisiológico del huésped, el estado de preñez y su edad, y también la presencia de otros agentes patógenos (Brodersen, 2004). La mayoría de este tipo de infecciones son causadas por NCP BVDV. Los animales infectados eliminan el virus en las secreciones nasales y orales, y en menor medida en las heces y la orina.
Esta forma de infección es importante en vacas preñadas debido a la capacidad del virus de atravesar la placenta y causar infecciones intrauterinas del feto (Smith et al., 2008).
La infección de animales inmunocompetentes, seronegativos y no preñados, en el 70-90% de los casos resulta en una infección subclínica o enfermedad clínica leve. En unas pocas situaciones, los animales desarrollan un síndrome clínico como el clásico BVD, principalmente los mayores de 6 meses. Luego de un período de incubación que dura 5-7 días, los animales comienzan a desarrollar fiebre, leucopenia y viremia que puede persistir hasta 15 días. Como se mencionó anteriormente, el virus está presente en los leucocitos (sobre todo monocitos y linfocitos) y en el plasma. Los signos clínicos incluyen letargia, anorexia, descarga oculonasal leve, diarrea, erosiones leves en la mucosa y úlceras (Uzal et al., 2016).
Otra forma de presentación es la DVB aguda grave. Desde principios de la década de 1990, se ha reconocido este síndrome que cursa con alta morbilidad y mortalidad variable en animales susceptibles, sobre todo animales jóvenes, y que se asocia a NCP. Las infecciones primarias con unas pocas cepas de BVDV-2 altamente virulentas causan este síndrome con un curso hiperagudo a agudo y signos de fiebre, muerte súbita, diarrea o neumonía. La patogénesis del BVDV-2 se relaciona con mayor frecuencia con una mayor virulencia de la cepa (Fulton et al., 2006; Luzzago et al., 2001). En algunos casos, puede haber también un síndrome trombocitopénico con síntomas clínicos que incluyen epistaxis, hipema, hemorragias mucosas, sangrado en el lugar de la inyección y diarrea con sangre (Peterhans et al., 2003).
Por otro lado, también se pueden dar infecciones fetales. La infección por BVDV en bovinos preñados puede provocar varios síndromes, incluida la muerte embrionaria temprana, efectos teratogénicos en el feto y el desarrollo de animales persistentemente infectados (PI) (Lanyon et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, durante la preñez, BVDV tiene la capacidad de atravesar la placenta y provocar infecciones intrauterinas. El resultado de las infecciones fetales por BVDV en hembras susceptibles depende de la edad del feto cuando estuvo expuesto (Brock, 2003). Cuando una vaca preñada seronegativa se infecta con un biotipo NCP BVDV, el virus puede transferirse fácilmente al feto. Si la infección ocurre antes de los 25 días de gestación, el resultado puede ser muerte embrionaria o fetal, momificación,

aborto o mortinatos. Sin embargo, los fetos supervivientes serán normales y no estarán infectados. En cambio, frente a una infección entre los días 30 y 90 de la gestación, ventana inmunológica del desarrollo fetal (Moennig et al., 2005a), si el feto sobrevive invariablemente se convierte en PI (Grooms, 2004). De hecho, la mayoría de los nuevos PI detectados en un rebaño infectado serán el resultado de la IT en madres con una respuesta inmune normal (Moennig et al., 2005). Estos terneros permanecen virémicos de por vida y son inmunotolerantes a los virus homólogos NCP BVD. Cuando la infección ocurre en fases posteriores y hasta el día 150, puede haber formación de varios tipos diferentes de anomalías congénitas, como hipoplasia cerebelosa, cataratas, degeneración de la retina, neuritis óptica, malformaciones esqueléticas, hipotricosis y retraso general del crecimiento (Brock, 2003; Deregt & Loewen, 1995; Khodakaram-Tafti & Ikede, 2005). Finalmente, la infección luego del día 180 de gestación suele conducir al nacimiento de un ternero normal seropositivo.

Por último, existe una forma de presentación denominada enfermedad de las mucosas (EM). Este síndrome clínico-patológico es infrecuente y ocurre cuando los animales PI se sobreinfectan con una cepa CP de BVDV estrechamente relacionada, o probablemente más comúnmente, cuando el virus que causa la infección congénita persistente desarrolla espontáneamente una mutaciones o recombinación genómica (Lanyon et al., 2014)

El resultado es una infección abrumadora que destruye las células y a la que el animal es incapaz de responder (Uzal et al., 2016). La EM afecta a ganado PI de todas las edades, pero a menudo ocurre entre las edades de 6 meses y 2 años. Se caracteriza por una baja morbilidad y alta mortalidad, y los animales mueren normalmente entre 1 y 2 semanas después de la aparición de los signos clínicos, que incluyen anorexia, fiebre, diarrea, deshidratación, presencia de lesiones en la mucosa del tracto digestivo, necrosis del tejido linfoide, inflamación de las pezuñas, pérdida de la condición corporal y muerte (Wilhelmsen et al., 1991). Los exámenes post mortem revelan erosiones y úlceras en la mucosa en varios sitios a lo largo del tracto gastrointestinal, siendo esta la lesión más prominente (Baker, 1995). La dermatitis también es un signo frecuentemente presente en la EM y es el hallazgo común de BVDV en muestras de biopsia de piel en ganado PI, lo que confirma el tropismo del virus por las células epiteliales (Dabak et al., 2007).

4.3.5.1 Animales persistentemente infectados (PI)

Cuando el biotipo NCP de BVDV infecta a la madre durante el primer trimestre, el sistema inmunológico inmaduro del feto aún no es capaz de desarrollar una respuesta inmune suficiente y el virus produce el PI. Debido a que el sistema inmunológico del feto pasa a reconocer el virus como parte de su composición, el mismo permanece en el ternero mientras viva. Los animales infectados persistentemente son virémicos (virus positivos y anticuerpos negativos o seronegativos) y eliminan continuamente grandes cantidades de BVDV en todas las secreciones corporales, incluidas: secreción nasal, saliva, semen, heces, etc (Fray et al., 2000; Houe, 1995). Es por esto que el animal PI juega un papel importante en la sostenibilidad y reservorio del BVDV en el medio ambiente ya que representa un riesgo de infección importante para otros animales dentro del rebaño y también en rebaños en estrecho contacto (Neill, 2013). La prevalencia de los animales PI es mayor al nacer y disminuye con la edad. Se estima que la mayoría sucumben a la EM generalmente entre los 6 meses y los 2 años de edad (Odeón et al., 2003; Uzal et al., 2016). Aproximadamente el 50% morirán durante el primer año de vida debido a otros patógenos que los afectan más severamente (Smirnova et al., 2008). Los terneros que nacen PI a veces son débiles, pueden parecer normales, pero con frecuencia son de mal desempeño, con tasas de

crecimiento reducidas, inmunosupresión y mayor morbilidad y mortalidad porque son más susceptibles a muchas enfermedades como la neumonía. Sin embargo, aquellos que llegan a reproducirse, siempre dejarán descendencia PI (aunque a menudo no sobreviva). Los toros PI pueden producir semen de calidad aceptable, pero pueden estar asociados con infertilidad (Moennig et al., 2005).
Debido a que los terneros PI sirven como uno de los principales reservorios que mantienen el BVDV dentro de la población bovina y son clave para su transmisión porque excretan grandes cantidades del virus a lo largo de su vida y no pueden desarrollar anticuerpos contra el BVDV, es sumamente importante identificar y retirar a estos animales del rebaño. A su vez, se considera que son 10 veces más infecciosos que aquellos con IT (Moerman et al., 1993), ya que estos últimos por el contrario, son menos importante para la transmisión de enfermedades, a menudo presentan signos clínicos leves y excretan el virus sólo durante un período corto (~14 días) (Brownlie et al., 1987).
Sin embargo, una preocupación acerca de esto es que no pueden identificarse fácilmente durante toda la vida del animal, especialmente inmediatamente después del nacimiento debido al efecto de enmascaramiento excesivo de los anticuerpos del calostro (Lanyon et al., 2014). El éxito de cualquier programa para erradicar el BVDV de una población bovina depende de la capacidad de detectar todos los animales PI (Nelson et al., 2016; Van Campen, 2010).

4.3.6 RESPUESTA INMUNE

Varios estudios investigaron el impacto del biotipo del virus en el curso de la respuesta inmune contra los BVDV. El análisis comparativo de la respuesta inmune a los biotipos NCP y CP de BVDV sugiere un mayor potencial para que NCP BVDV induzca inmunidad humoral, mientras que la infección con CP-BVDV resultó en una mejor inmunidad mediada por células (Lambot et al., 1997). A su vez, existen diferencias en cuanto a la respuesta inmune innata entre estos dos biotipos. Las cepas CP estimulan un rápida y potente respuesta temprana local con la liberación de IFN tipo I, lo que favorecerá la activación de células efectoras y limitará la replicación del virus a nivel de mucosas (Brackenbury et al., 2003); por otro lado las cepas NCP no son tan estimulantes, por lo que no generan una inmunidad a nivel de mucosas y permiten la diseminación del virus por todo el organismo (Glew et al., 2003). En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, la inmunidad protectora después de la infección natural por BVDV se caracteriza por la activación de respuestas inmunes humorales y celulares específicas (Collen & Morrison, 2000). Debido a su papel central en la guía de las respuestas inmunes humorales y mediadas por células, las células T CD4+, que se dirigen principalmente a las proteínas NS3 y E2, son actores clave en el desarrollo de la inmunidad protectora contra el virus (Collen et al., 2002). En este caso, el virus estimula la producción por parte de los linfocitos T CD4+ de altos niveles de IL-4, pero no de IL-2 e IFN, favoreciendo una respuesta Th2. Esto podría interferir con el desarrollo de una respuesta Th1 protectora frente a otros agentes patógenos como el BoHV-1, lo que a su vez puede contribuir con el establecimiento de infecciones persistentes (Molina et al., 2008).
Por otra parte, después de la activación de las células B, los anticuerpos neutralizantes son detectables a partir del día 14 de la infección (Collen & Morrison, 2000) y dependiendo de la cepa involucrada, pueden mantenerse hasta las 10-12 semanas aproximadamente, o bien persistir durante toda la vida del animal (Fredriksen et al., 1999). Los anticuerpos neutralizantes más eficaces se dirigen principalmente a la proteína de superficie E2 (Lambot

et al., 1997; Molina et al., 2008), mientras que los anticuerpos específicos de Erns poseen menos actividad neutralizante (Donis, 1995). Si bien algunos anticuerpos se dirigen a E1, la principal proteína estructural del BVDV (C) no induce la activación de las células B ni la producción de anticuerpos. Además, la proteína no estructural NS2-3 induce una fuerte respuesta de anticuerpos (Donis, 1995). La cantidad de anticuerpos neutralizantes que se produce va a depender del genotipo causante de la infección, siendo mayor en los animales infectados por el genotipo 2 (Molina et al., 2008). A pesar de todo esto, muchos virus, incluido el BVDV, utilizan varias estrategias únicas de evasión inmunitaria para secuestrar la respuesta inmunitaria del huésped y garantizar una replicación viral exitosa y su propagación de un huésped a otro. Estas incluyen la adaptación de varias estrategias de supervivencia viral, el enfoque de “atacar y huir” y la persistencia viral (Peterhans et al., 2003). Por otro lado, estas no solo reducen los valores de los ensayos de diagnóstico utilizados actualmente para identificar las cepas del virus recién emergidas, si no que también favorecen la aparición de nuevas variantes y cepas del virus, que pueden tener impactos negativos sobre las vacunas BVDV actualmente utilizadas en la protección de los animales en riesgo (Al-Kubati et al., 2021). En base a esto, es considerable remarcar que la infección persistente y la respuesta inmune desregulada son dos consecuencias importantes de las infecciones por BVDV (Walz et al., 2020).

4.3.7 DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de esta enfermedad existen dos enfoques, ya sea si estamos identificando el virus o detectando la respuesta inmune. Por eso, se pueden distinguir dos clasificaciones de métodos de prueba de diagnóstico para el BVDV (Houe et al., 2006): los que determinan el virus (que indican una infección activa) y los que detectan anticuerpos contra el BVDV (que indican una infección previa). Existen pruebas de diagnóstico que detectan el virus, antígenos (Ag) específicos y anticuerpos (Abs) específicos, y generalmente se han reportado como confiables (Dubovi, 2013). Si se quiere detectar con precisión el virus o Ag específico, ya sea para investigar un caso individual de enfermedad, erradicar la enfermedad o identificar animales PI, está indicado el uso del aislamiento viral, ELISA, imnunohistoquímica (IHC) y RT-PCR (Saliki & Dubovi, 2004). Como tanto los animales PI como los TI son virémicos, es necesario realizar dos pruebas de antígenos con un intervalo de al menos tres semanas para distinguir los animales PI de los TI (Larson et al., 2005). Dentro de estas técnicas, a pesar de que el aislamiento viral está descrita como “gold standard” para el diagnóstico, la que ha cobrado mayor relevancia y es aceptada hoy en día como estándar es la RT-PCR debido a las ventajas que presenta, ya que es más sensible, requiere menos tiempo, es menos costoso y no se limita a los laboratorios con instalaciones de cultivo celular (Lanyon et al., 2014). Esta técnica permite analizar una gran variedad de muestras (Kim & Dubovi, 2003), permite diferenciar infecciones agudas de persistentes (Bhudevi & Weinstock, 2003) e identificar si es BVDV-1 o BVDV-2 (Letellier et al., 1999). Los ELISA Ag son un método sencillo y rápido para la detección de animales PI en gran escala (Horner et al., 1995), con sensibilidades y especificidades de Ag ELISA,que van del 67% al 100% y del 98,8% al 100%, respectivamente, en comparación con el aislamiento del virus (Saliki et al., 1997). Alternativamente, se pueden realizar pruebas de una etapa con la ayuda de datos epidemiológicos (Marschik et al., 2018) o utilizando métodos de prueba de diagnóstico específicos, como la inmunohistoquímica (IHC) en muestras de biopsia de piel (Brodersen, 2004).

En cuanto a la detección de Ac, estas técnicas proporcionan información valiosa sobre la inmunidad individual y la exposición previa al virus, y desempeña un papel crucial en la orientación de estrategias de control. Una prueba positiva de anticuerpos en animales no vacunados indica exposición previa, lo que a menudo conduce a una seropositividad de por vida (Houe, 1995), y confirma la no persistencia de la infección. Sin embargo, un resultado negativo de anticuerpos no garantiza la ingenuidad al BVDV, siendo necesario realizar pruebas adicionales para confirmar la ausencia de PI (Lanyon et al., 2014). Hay varios métodos de detección de Ac disponibles como el inmunoensayo enzimático dot-blot, rápido, simple, económico y confiable (Hemmatzadeh & Amini, 2009) y la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (AGID) (Lanyon et al., 2013). Sin embargo, las técnicas más utilizadas son Seroneutralización (SN) y ELISA . La SN es una prueba muy específica, pero es costosa y requiere mucho tiempo debido a la necesidad de un cultivo celular. Se basa en la inhibición de la replicación viral mediante Ac presentes en una muestra de suero (Houe et al., 2006), pero puede tener resultados variables entre laboratorios como resultado del uso de diferentes cepas de virus o tipos de células (Dubovi, 2013). Como alternativa eficiente y económica, se puede utilizar los ELISA Ac, que cuentan con la ventaja de ser rápidos y permiten analizar una variedad de muestras (Nettleton & Entrican, 1995). Hay múltiples ELISA disponibles comercialmente para la detección de Ac específicos del BVDV y han sido validados para su uso en diversas muestras, incluido suero y leche, y detectan anticuerpos calostrales en terneros lactantes (Fux & Wolf, 2012). Como aún no hay vacunas marcadoras para BVDV disponibles (Raue et al., 2011), las pruebas inmunológicas no pueden diferenciar de manera rutinaria entre animales vacunados y naturalmente infectados, y se ha demostrado que esto es un posible motivo de preocupación al interpretar los resultados de las pruebas a nivel regional o nacional (Wernike et al., 2017).

4.3.8 CONTROL Y PREVENCIÓN

Con los avances en las tecnologías de diagnóstico, específicamente el desarrollo de técnicas ELISA para la detección del Ag BVDV y de anticuerpos específicos, se han vuelto posibles exámenes masivos y rentables (Fenton et al., 1991; Gottschalk et al., 1992). A su vez, el análisis serológico de muestras aleatorias de suero o de leche a granel permitió evaluar el estado de cada animal o rebaño, y el desarrollo de protocolos de PCR para identificar y eliminar animales PI colaboró en privar al BVDV de su reservorio en rebaños individuales y en poblaciones bovinas, incorporando sensibilidad y capacidad de analizar muestras agrupadas (Dubovi, 2013). Varios países han tenido éxito en la implementación de métodos de diagnóstico rentables como medida de control de la BVD. Un ejemplo son los países escandinavos (Dinamarca, Noruega y Suecia). Dado que la vacunación nunca se había implementado en estos países, fue posible identificar rebaños con una infección activa por BVD mediante métodos serológicos. A partir de estos resultados se centraron en buscar al animal PI para posteriormente eliminarlo del rodeo y restringir los movimientos para impedir la diseminación, haciendo monitorizaciones periódicas hasta eliminar el virus. Estos programas fueron exitosos, y luego de algunos años estos países estaban en gran medida libres de BVDV, confirmando un costo beneficio-favorable (Valle et al., 2005).
Sin embargo, no todos los países están en la misma situación epidemiológica para poder implementar la misma medida de control. Un ejemplo es Suiza, que en 2008 ya tenía una alta prevalencia de BVD (>80% de ganado con anticuerpos BVD positivos) en la población bovina nacional. Durante el primer año, se enfocaron en buscar y eliminar los animales PI, y

posteriormente realizaron pruebas de BVDV en todos los terneros recién nacidos utilizando muestras de la muesca de la oreja, logrando reducir la prevalencia de animales PI del 1,3% al 0,02% (Bachofen et al., 2013). La realidad es que, en rodeos donde la BVD es endémica, al tener una seroprevalencia alta (casi 90%) las nuevas infecciones no tienen consecuencias dramáticas, debido a que los animales susceptibles son muy pocos (Moennig & Becher, 2018). Sin embargo, al controlar esta enfermedad sin vacunación y con la eliminación de los animales PI, los rodeos susceptibles (seronegativos) quedan expuestos a una reintroducción del virus que puede tener consecuencias graves, generando máximo daño con respecto a la enfermedad clínica aguda y efectos sobre la fertilidad, lo que subraya la necesidad de una bioseguridad estricta como parte integral de cualquier programa de control de BVD. Es por eso que países como Alemania, han utilizado la vacunación como parte del programa de control ya existente de prueba y sacrificio de animales PI, tenido bastante éxito ya que la prevalencia de PI cayó del 0,48% en 2011 al 0,02% en 2016 (Wernike et al., 2017). En Uruguay, a pesar de que la BVD es una de las principales enfermedades virales que afecta al ganado nacional, las pérdidas ocasionadas por este agente son desconocidas. Actualmente, no existe una obligatoriedad de vacunación contra BVDV y tampoco se ha implementado un plan oficial voluntario de control para mitigar las posibles pérdidas asociadas a esta enfermedad.

4.3.8.1 Vacunación

Debido a la importancia de los animales PI en la propagación de la infección, el objetivo de las estrategias de vacunación contra el BVDV se centra principalmente en la protección fetal, además de prevenir la enfermedad clínica y la desregulación inmune inducida por el virus. Los programas de vacunación de control contra el BVDV implican el uso de diferentes tipos de vacunas vivas atenuadas, muertas y recombinantes (Moennig & Becher, 2018).

Si bien tanto las vacunas vivas atenuadas como las vacunas inactivadas pueden prevenir las manifestaciones clínicas de BVDV, existe una diferencia en cuanto a su seguridad para la vacunación en diversas poblaciones de ganado. Se han desarrollado vacunas vivas atenuadas contra el BVDV para generar respuestas inmunitarias fuertes, especialmente utilizando CP-BVDV, que se considera más seguro al no infectar al feto (Fulton et al., 2020). Por esta razón, no se recomiendan las vacunas basadas en NCP BVDV, y aunque se han desarrollado mutaciones para abordar la seguridad de las mismas (Meyers et al., 2007), la capacidad de algunas de estas mutaciones para cruzar la placenta requiere más investigación (Wernike et al., 2018). Diversos efectos adversos asociados con vacunas vivas atenuadas han impulsado la necesidad de vacunas muertas seguras, administrables en cualquier edad y etapa de la preñez (Newcomer et al., 2015). Las vacunas muertas, a pesar de ser más seguras que las vacunas vivas atenuadas, tienen menor inmunogenicidad, lo que requiere múltiples dosis para desarrollar la inmunidad. Informes recientes indican que la vacunación con diferentes vacunas inactivadas contra BVDV no logra inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada contra todas las cepas de virus (Sozzi et al., 2020). Aunque estas vacunas pueden generar altos niveles de anticuerpos, la eficacia de la inmunidad mediada por células es variable (Platt et al., 2008), y la protección fetal después de la vacunación con vacunas muertas puede variar desde incompleta hasta satisfactoria (Rodning et al., 2010). A su vez, otro problema que se presenta es la gran variabilidad genética de BVDV, ya que las vacunas deben garantizar protección cruzada contra diversas especies y cepas presentes en los rebaños (Griebel, 2015). En respuesta a esta necesidad, la mayoría de las vacunas actuales son multivalentes, abarcando tanto a BVDV-1 y BVDV-2 como otras cepas de enfermedades reproductivas o virus respiratorios del ganado bovino

(Newcomer y col., 2017b). Un estudio anterior mostró la protección cruzada entre los BVDV tipo 1 y tipo 2 (Dean & Leyh, 1999), sin embargo el estudio de Anziliero et al. (Anziliero et al., 2015) reveló que la inmunogenicidad del componente BVDV-1 fue indetectable en al menos cuatro vacunas, y BVDV-2 en al menos seis vacunas. Esto resalta el obstáculo que representa la variabilidad antigénica del virus para obtener respuestas satisfactorias en la vacunación. Es crucial abordar estos desafíos para mejorar la eficacia de las vacunas contra el BVDV.

En Uruguay, las vacunas disponibles comercialmente para prevenir BVD están fabricadas con virus inactivado y, a diferencia de las vacunas vivas modificadas utilizadas en otras regiones, solo pueden proporcionar protección parcial (Newcomer et al., 2017a). A su vez, no hay estudios que evalúen la eficacia de estas vacunas en términos de generación de anticuerpos neutralizantes, reducción de los signos clínicos, ni en relación con el estado serológico para BLV.

5. HIPÓTESIS

Existe asociación negativa entre animales asintomáticos infectados con BLV y la respuesta inmune a la vacunación de bovinos contra BVDV y BoHV-1

6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmune frente a la vacunación a campo contra BVDV y BoHV-1 en animales infectados con BLV.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el título de anticuerpos totales, neutralizantes, IgG1 e IgG2 contra el BoHV-1 en animales libres e infectados con BLV
- Determinar el título de anticuerpos totales y neutralizantes contra el BVDV en animales libres e infectados con BLV
- Analizar en los distintos grupos, componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa celular mediante citometría de flujo
- Asociar la respuesta inmune humoral frente a BoHV-1 y BVDV con el estatus de infección para BLV

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 CARACTERIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO

El estudio se realizó en la recría de un predio lechero comercial de 200 vacas en ordeñe de la localidad de Berrondo, departamento de Florida. Los animales del estudio se encontraban en recría colectiva en corrales con alimentación de pasturas y concentrados.
Dicho establecimiento presenta antecedentes de EBL tanto serológicos cómo observación de enfermedad clínica (linfosarcomas) en ganado adulto.

8.2 SELECCIÓN DE ANIMALES Y CONFORMACIÓN DE LOS GRUPOS

Se utilizaron 30 bovinos Holando hembras de 6 meses y se conformaron dos grupos; uno BLV+ (n=15) y otro BLV- (n=9), los cuales fueron inmunizados y muestreados. Previamente se les realizó un chequeo serológico a los animales para los tres virus, ingresando al estudio aquellos serológicamente negativos para los virus BVDV y BoHV-1. A su vez, también se descartó la presencia de animales PI.
Se contó con la aprobación del protocolo experimental, por parte de la Comisión de Ética de uso de animales (CEUAFVET-972, Exp. 111900-001057-19).

8.3 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

El protocolo de inmunización se realizó utilizando una vacuna comercial contra IBR y BVD, (vacuna inactivada polivalente compuesta por una suspensión acuosa de BoHV-1, BVDV tipo 1 y 2, cepas bacterianas de *Campylobacter fetus fetus y fetus veneralis, Leptospira interrogans Pomona pomona, Histophilus somni* e Hidróxido de aluminio como adyuvante) Se administró la primera dosis el día 0 y un booster el día 24. Se tomaron muestras de sangre a partir de la vena coccígea con jeringas estériles en tubos secos y tubos con anticoagulante (Citrato de sodio y EDTA) los días 0, 7, 24, 36 y 60 post inmunización.

8.4 PROCESAMIENTO DE LA SANGRE EN EL LABORATORIO

Las muestras en tubo seco se dejaron coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 2000 rpm por 20 minutos. El suero fue extraído y almacenado a -20ºC hasta su procesamiento.
Las muestras con anticoagulante que fueron tomados por duplicado, se procesaron de dos formas. Una partida de muestras fueron centrifugadas a 1700 rpm durante 20 min para posteriormente extraer el *buffy coat*. El mismo se diluyó en buffer salino fosfato (PBS) y fue sembrado suavemente sobre Ficoll-Paque PLUS. Se realizó una segunda centrifugación a 2200 rpm por 25 minutos a 20ºC y luego se extrajeron las células mononucleares (PBMC). Finalmente se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos a 20ºC y el pellet resultante fue resuspendido en PBS para su posterior utilización. Todas las muestras fueron llevadas a una concentración similar y se almacenaron a −20°C hasta su utilización.
Los duplicados de estas mismas muestras fueron almacenados a -20ºC para su posterior utilización en la extracción de ADN.

8.5 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BLV

Se utilizó un kit de ELISA comercial para BLV disponible en plaza para la cuantificación de anticuerpos totales en suero bovino (IDEXX Leukosis Serum Screening, Ref: P02110-10).

Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, los sueros fueron diluídos 1:20 y se colocaron, junto con los controles negativos y positivos, en los pocillos sensibilizados con el antígeno BLV. Tras una incubación de 1 hora a 37ºC se realizaron los lavados correspondientes y se adicionaron 100µl del conjugado. Luego de una incubación a la misma temperatura por 30 minutos, se realizó una nueva tanda de lavados y se agregaron 100µl de la solución cromogénica (TMB). Se dejó incubar la placa por 20 minutos a temperatura ambiente cubierta y lejos de la luz directa. Finalmente se adicionaron 100µl de la solución de frenado y se procedió a la lectura, realizada a una longitud de onda de 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se consideraron positivas aquellas muestras con un resultado superior a 60%.

8.6 ELISAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BVDV

Se utilizó un kit de ELISA comercial (Bio-X Diagnostics, BIO K 283 - Monoscreen AbELISA BVDV (E0) / blocking) para la detección de anticuerpos contra BVDV. Brevemente, se colocaron los sueros problema y los controles positivo y negativo diluídos 1:2, en placas sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal específico de la proteína E0 del BVDv. Tras una incubación de 2 horas a 37ºC se realizaron los lavados correspondientes y se colocaron 100µl del conjugado diluído 1:50 (anticuerpo monoclonal específico contra la proteína E0 del BVDv conjugado a peroxidasa HRP). Se incubó por 30 minutos a la misma temperatura y, luego de los lavados correspondientes, se adicionaron 100µl de la solución cromogénica (TMB). Se incubó la placa a temperatura ambiente protegida de la luz directa durante 10 minutos y finalmente se colocaron 50µl de la solución de frenado. Se realizó la lectura a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue inversamente proporcional al título de la muestra de suero y se consideraron positivas aquellas muestras con un resultado superior a 50%.

Por otra parte, se utilizó otro kit de ELISA comercial (IDEXX BVDV p80 Ab) para la detección de anticuerpos frente a la proteína p80 del BVDV). Dicho ELISA detecta anticuerpos relacionados a la replicación viral, por lo que se utilizó para descartar la respuesta a infección natural por BVDV. Brevemente, se colocaron los sueros problema y los controles positivo y negativo diluídos 1:2, en placas sensibilizadas con con la proteína p80 fijada a los pocillos mediante un anticuerpo específico WB103. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente se realizaron los lavados correspondientes y se colocaron 100µl del conjugado diluído 1:100 (anticuerpo monoclonal anti-proteína p80 unido a una enzima). Se incubó durante 30 minutos a la misma temperatura y, luego de los lavados correspondientes, se adicionaron 100µl de la solución cromogénica (TMB). Se incubó la placa a temperatura ambiente protegida de la luz directa durante 20 minutos y finalmente se colocaron 100µl de la solución de frenado. Se realizó la lectura a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-proteína p80 presentes en la muestra y se consideraron positivas aquellas muestras con un resultado menor o igual a 40%.

8.7 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO BVDV

Se utilizó al inicio del ensayo un kit de ELISA comercial (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, Ref: 99-43830) para poder descartar la presencia de posibles animales PI. Siguiendo las indicaciones del fabricante se colocaron 50µl de solución de detección en cada pocillo, además de los controles positivo y negativo, en placas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales específicos para la glicoproteína Erns de BVDv. Posteriormente se añadieron 50µl de cada muestra y se incubó la placa a 37ºC durante dos horas. Luego de realizar los lavados correspondientes, se agregó 100µl de conjugado en cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se realizó una nueva tanda de lavados y se

agregó 100µl de la solución cromogénica (TMB) a la placa, dejándola en incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, tapada y protegida de la luz. Tras una adición de 100µl de solución de frenado la lectura de la D.O. se efectuó a 450 nm. en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color resultante de la actividad enzimática es proporcional al contenido de elementos patógenos en las muestras. Esta prueba ELISA permitió la detección de animales PI para BVD, y se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo resultado fue mayor a 0,300. Es importante mencionar que esta técnica fue efectuada a los días 36 y 60 del ensayo en aquellas muestras que no levantaron títulos de anticuerpos.

8.8 ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BoHV-1

8.8.1 *ANTICUERPOS TOTALES*

Se utilizó un kit comercial de ELISA (Bio-X Diagnostics, BIO K 238 - Monoscreen AbELISA BoHV-1/indirect, double wells) para la detección de anticuerpos totales anti BoHV-1. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se realizaron diluciones 1:100 de los sueros problema, los controles (positivos y negativos) y el tracer (muestra de referencia del kit). Se colocaron 100µl de cada uno por pocillo en la placa sensibilizada con un purificado del BoHV-1, dejándose incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes se le adicionaron 100µl del conjugado diluido 1:50 (proteína G marcada con HRP), y se incubó durante 1 hora a la misma temperatura. Tras una nueva etapa de lavado, se agregó 100µl de solución cromógeno (3,3',5,5'- Tetrametilbencidina o TMB) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, cubierto y protegido de la luz. Finalmente se colocaron 50 µl de solución de frenado en cada pocillo y se procedió a realizar la lectura a 450nm en un espectofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue proporcional al título de anticuerpos en la muestra y se consideraron positivas aquellas cuyo título fue superior a 30% en diferentes grados de positividad.

8.8.2 *ISOTIPOS IgG1 E IgG2*

Para detectar los isotipos IgG1 e IgG2, se utilizó un kit de ELISA *in house* indirecto, que fue desarrollado en el laboratorio de Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Uruguay (Leites y Puentes, 2017), utilizando conjugados bovinos comerciales (Jackson Inmuno Research Laboratories INC). Se colocaron 50µl de los sueros por duplicado y diluidos 1:2 con solución de dilución rojo fenol y los controles positivo y negativo, control celular y de antígeno, en las placas previamente sensibilizadas con antígeno viral (cepa LA de BoHV-1).
Se incubó durante 1 hora a 37ºC y, luego de los lavados correspondientes, se adicionó el conjugado apropiado para cada subclase de IgG. Se realizó una nueva incubación de 1 hora a la misma temperatura y, luego de un nuevo lavado, se colocaron 50µl de solución TMB en cada pocillo. Luego de una incubación de 20 minutos (lejos de la luz directa) se realizó el revelado colocando 50µl de solución de frenado. La lectura de la densidad óptica se realizó a 450nm en un espectofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se consideraron positivos aquellos sueros con un porcentaje igual o mayor a 120%.

8.9 SERONEUTRALIZACIÓN (SN) *in vitro* CONTRA BoHV-1

Para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 en los animales inmunizados, se realizó la técnica de Seroneutralización *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de la OMSA (OMSA, 2017). Las células utilizadas en esta técnica se obtuvieron realizando cultivos de la línea celular MDBK - CRIB (Flores y Donis, 1995) que fueron mantenidas en

crecimiento a 37°C en Medio Esencial Mínimo (MEM) (gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico al 1% (solución de Penicilina/Estreptomicina 100x con L-glutamina). Las mismas se incubaron hasta alcanzar una confluencia celular de 80-100%. Inicialmente, se realizó la inactivación del complemento de cada una de las muestras a 56ºC durante 30 minutos. Luego, en placas estériles de 96 pocillos, se colocaron 50µl de cada suero por duplicado y en diluciones crecientes (1:2 hasta 1:256) junto a la misma cantidad del virus BoHV-1 (cepa Los Ángeles) conteniendo 100 unidades infectantes (UI) de BoHV-1. Cada placa contó con sus respectivos controles celulares y control de virus descarga 100 UI, 10 UI y 1 UI. Tras una incubación de 24 horas en estufa a 37ºC, en atmósfera con 5% de CO2, se adicionaron 50µl de una suspensión de células CRIB (ajustada a una concentración de 30.000 células/50µl en MEM suplementado con SFB al 5% y antibiótico al 1%). Durante los siguientes 5 días de incubación se evaluó el efecto citopático en cada pocillo cada 24hs aproximadamente, determinándose el título seroneutralizante para cada uno de los sueros problemas (previa verificación del resultado en los sueros controles empleados en la prueba). Se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo título de anticuerpos neutralizantes fue igual o superior a 1/16 (Pospíšil y col., 1996).

8.10 SERONEUTRALIZACIÓN (SN) *in vitro* CONTRA BVDV

Para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra BVDV 1 en los animales inmunizados, se realizó la técnica de Seroneutralización *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de la OMSA (OMSA, 2018). Las células utilizadas en esta técnica se obtuvieron realizando cultivos de la línea celular MDBK que fueron mantenidas en crecimiento a 37°C en Medio Esencial Mínimo (MEM) (gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico al 1% (solución de Penicilina/Estreptomicina 100x con L-glutamina). Las mismas se incubaron hasta alcanzar una confluencia celular de 80-100%. Inicialmente, se realizó la inactivación del complemento de cada una de las muestras a 56ºC durante 30 minutos. Luego, en placas estériles de 96 pocillos, se colocaron 50µl de cada suero por duplicado y en diluciones crecientes (1:2 hasta 1:128) junto a la misma cantidad del virus conteniendo 100 unidades infectantes (UI) de BVDV (cepa NADL). Cada placa contó con sus respectivos controles celulares y control de virus descarga 100 UI, 10 UI y 1 UI. Tras una incubación de 1:30 hs en estufa a 37ºC, en atmósfera con 5% de CO2, se adicionaron 50µl de una suspensión de células MDBK (ajustada a una concentración de 30.000 células/50µl en MEM suplementado con SFB al 5% y antibiótico al 1%). Durante los siguientes 5 días de incubación se evaluó el efecto citopático en cada pocillo cada 24hs aproximadamente, determinándose el título seroneutralizante para cada uno de los sueros problemas (previa verificación del resultado en los sueros controles empleados en la prueba. Se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo título de anticuerpos neutralizantes fue igual o superior a 1/16 (Bolin & Ridpath, 1995).

8.11 DETERMINACIÓN DE LA CARGA PROVIRAL DE BLV MEDIANTE *ddPCR*

Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre entera usando un protocolo de Fenol-Cloroformo. El ADN obtenido fue cuantificado a través de un espectrofotómetro UV-vis (NanoDrop;Thermo Fisher). Luego, el ADN fue digerido con *Bam*HI (Bioron) a 37°C por 15 minutos, y la enzima se inactivó por calor durante 20 minutos a 65°C.
Luego de este proceso, se realizó la *ddPCR* (sistema de PCR digital de gotas QX200; Bio-Rad) según el protocolo estandarizado por De Brun et al., 2022. Las secuencias del cebador fueron F: 5′-CAGTGACTGGGTTCCCTCTGTC-3' y R: 5′-AGGGCGAGRCCGGGTCCAGAG-3'; la sonda era HEX 5′-CCCTCCCTGGGCTCCCGARA-3′-BHQ1. Como control positivo se utilizó ADN extraído de una línea celular FLK-BLV. Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Corning) suplementado con un 5% de suero fetal bovino inactivado. Se empleó un plásmido

recombinante que codifica la glicoproteína gp51 (vector Ptop-Blunt-V2; Macrogen) como control positivo adicional. Como control sin molde, se utilizó agua ultrapura (no-template control, NTC) para evitar falsos negativos. Brevemente, en un ensayo típico de 20 µL, se mezcló 1 µL de muestra de ADN con 1 µL de cada cebador (10 µM), 0,5 µL de sonda (10 µM) y 2 × Supermix emulsionado con aceite (Bio-Rad); las gotitas generadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos (Eppendorf). El ensayo de PCR se realizó en un termociclador (ciclador táctil C1000; Bio-Rad) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, luego 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C y 10 minutos a 58 °C, con desactivación final de la enzima durante 10 min a 98°C. La presencia de gotas fluorescentes determinó el número de eventos positivos resultantes que se analizaron en el software (QuantaSoft v.1.7.4; Bio-Rad), mediante gráficos de puntos. Los resultados obtenidos se determinaron como copias/µl de ADN bovino y posteriormente se categorizaron en alta y baja carga, HPL y LPL respectivamente (De Brun et al., 2023).

8.12 PUESTA A PUNTO CITOMETRÍA DE FLUJO

8.12.1 *ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES*

Para cuantificar la proliferación de las células mononucleares *in vitro*, se utilizó un protocolo con Ki67. Esta proteína nuclear juega un rol importante en la regulación de la división celular y se expresa durante todas las fases activas de ésta (Soares et al., 2010). La expresión de esta proteína por las células T es un indicador específico y cuantitativo de proliferación. Brevemente, se descongelaron los PBMC que se mantenían almacenados en -80ºC. Se cultivaron en placa de 96 a una concentración ajustada de 200.000 células por pocillo en un volumen final de 200µl de RPMI con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB). Los pocillos de ensayo se estimularon con 100µl de cada virus inactivado y los controles se realizaron con Concanavalina A como mitógeno de células T y medio RPMI como control negativo. Las células se cultivaron por 5 días a 37ºC y luego se utilizaron para el marcaje de poblaciones celulares. Para esto, se levantaron las células de la placa sobre hielo y se pasaron a un eppendorf. Se utilizó un protocolo de marcación de anticuerpos intracelulares mediante la fijación con el reactivo Leucoperm A (*Biorad*) y luego se permeabilizaron con el Leucoperm B (*Biorad*). Se colocó el anticuerpo primario y se incubó durante 30 minutos. Luego se lavó adicionando 1ml de PBS/BSA y se centrifugó a 300g durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó el anticuerpo secundario. Se volvió a realizar el mismo lavado y se resuspendió finalmente en 200µl de PBS/BSA para su posterior procesamiento.

8.12.2 *MARCACIÓN DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B*

Las células luego de cultivadas y marcadas con el anticuerpo de proliferación Ki67 fueron posteriormente marcadas con anticuerpos específicos para cada población celular de la marca *Biorad*. Estos anticuerpos están asociados a un fluorocromo; en el caso de CD4 el fluorocromo fue RPE (MCA1653PE), en el caso de CD8 fue Alexa 647 (MCA837A647) y FITC (MCA837F), y para los linfocitos B fue FITC (MCA2431F). Las células se incubaron con cada anticuerpo durante 15 minutos a 4ºC. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se recogieron los datos en el citómetro de flujo modelo BD Accuri™ C6.

8.12.3 *MARCACIÓN DE INTERFERÓN gamma E IL-4*

Se determinó la concentración adecuada IFN gamma (IFNγ) e IL-4 con el objetivo de estudiar el perfil de la respuesta de las células TCD4 (Th1 y Th2) para BoHV-1 mediante la cuantificación de estas citoquinas. Ambas están marcadas con un fluorocromo, siendo FITC para IL-4 y Alexa 647 para IFNγ (MCA1783a647). Para eso se marcaron las células con anticuerpos específicos luego de los 5 días de cultivos celulares. Se utilizaron protocolos de marcación de anticuerpos intracelulares mediante la fijación con el reactivo Leucoperm A

(*Biorad*) y luego se permeabilizaron con el Leucoperm B (*Biorad*). Posteriormente se incubaron 30 minutos a 4ºC con los anticuerpos correspondientes y por último se lavaron con PBS. Se procesaron las muestras en el citómetro de flujo modelo BD Accuri™ C6.

8.13 ANÁLISIS DE DATOS

Se elaboraron planillas utilizando Microsoft Office Excel, registrándose a cada animal individualmente y los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos. Para comparar el título de anticuerpos obtenidos a las virosis reproductivas entre grupos positivos y negativos a BLV, se realizó una comparación de medias por la prueba t de student método Holm-Sidak con un nivel de significancia del 95 % (p 0.05), utilizando el software GraphPad Prism versión 8.4.3. Para el análisis de los resultados de citometría se utilizó el software BD Accuri™ C6 y se realizaron análisis descriptivos.

9. RESULTADOS

9.1 PREVALENCIA DE BLV

Al ingreso al estudio, la prevalencia serológica para BLV fue de 64% (16/25). Luego de pasados los 60 días, se constató que un animal seroconvirtió, por lo que la prevalencia final fue de 68% (16/24). Este animal no fue tomado en cuenta para el análisis.

9.2 ANTICUERPOS CONTRA BoHV-1

9.2.1 *ANTICUERPOS TOTALES*

Para el estudio de la cinética de anticuerpos totales contra BoHV-1 como se observa en la figura 1, no existen diferencias significativas entre grupos.
Con respecto a las diferencias entre días, se evidenció un aumento muy significativo en el título de anticuerpos totales recién en el día 24 post vacunación (pv) en ambos grupos. Luego del día 24 pv (booster) el aumento tiende a ser menos marcado, y hacia el día 60 pv del estudio hay una diferencia leve pero significativa en el grupo BLV+ que presenta mayores títulos con respecto al día 24 pv.

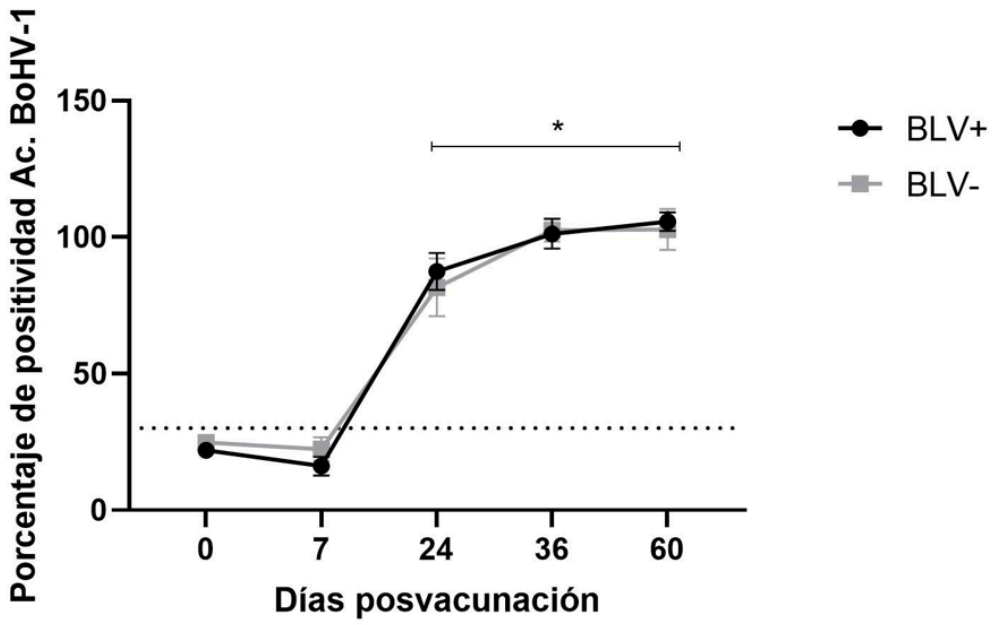


Figura 1. *Cinética del título de anticuerpos totales contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo.*
Animales positivos a BLV en círculos negros (BLV+ n=15), animales negativos a BLV en cuadrados grises (BLV- n=9). El eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de positividad de anticuerpos contra BoHV-1; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.2.2 *ISOTIPOS IgG1 E IgG2 CONTRA BoHV-1*

En cuanto al estudio de isotipos, en relación a IgG1 (figura 2a) se puede observar un aumento del título significativo para el grupo BLV- recién en el día 24 pv si lo comparamos con el inicio del estudio (día 0) y con el día 7 pv. Luego, haciendo la misma comparación en los tiempos: día 36 y 60 pv encontramos diferencias significativas en ambos grupos respecto al día 0 y 7 pv.
En cambio, observando la gráfica de IgG2 (figura 2b) se puede detectar un aumento significativo de anticuerpos al día 7 pv en los animales BLV+. Luego, en referencia a los demás días, no hay diferencias entre grupos pero sí se observa que el aumento del título es muy significativo el día 24 y 36 pv, alcanzando este último día el pico máximo, ya que al día 60 pv se observa un descenso, aunque no es significativo en comparación al día 36 pv.

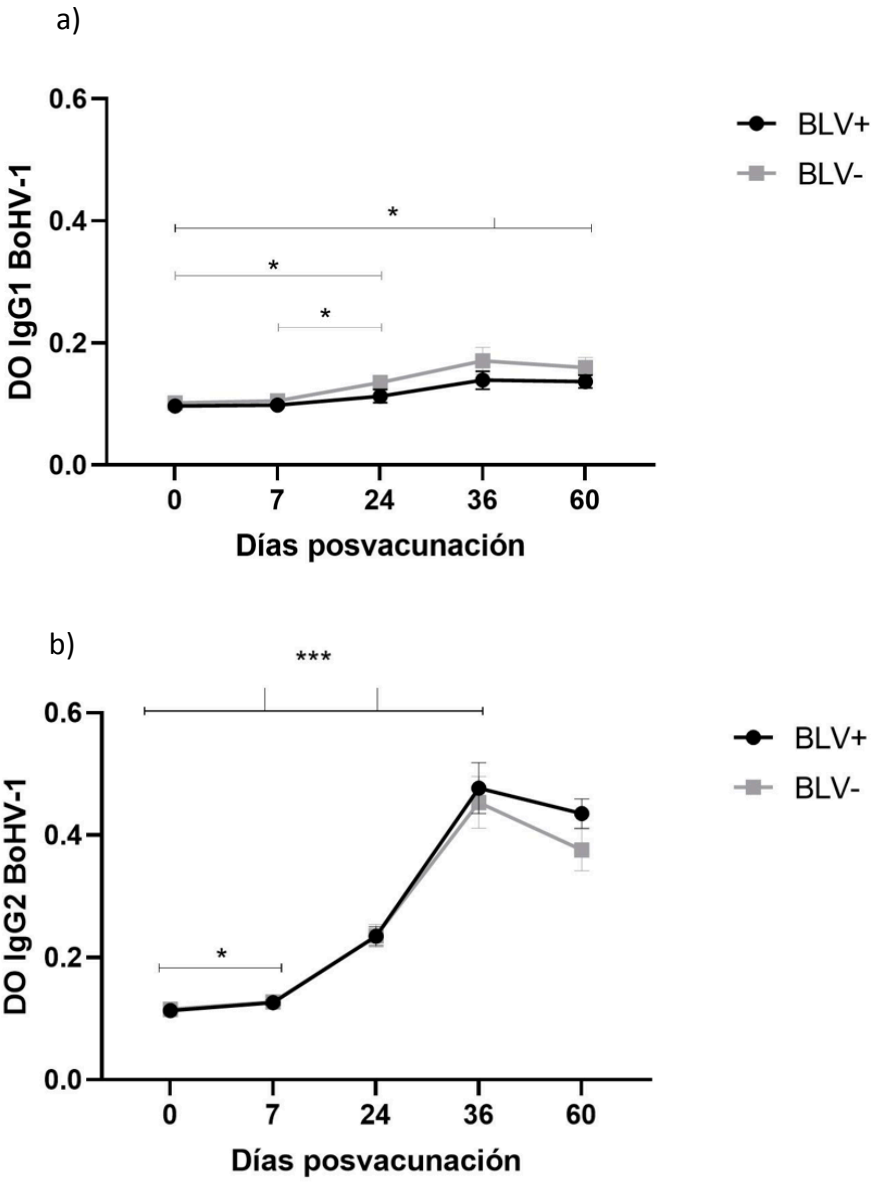


Figura 2. *Cinética del título de anticuerpos totales (isotipos IgG1 e IgG2) contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA in house a lo largo del ensayo.*
Animales positivos a BLV en círculos negros (BLV+ n=15), animales negativos a BLV en cuadrados grises (BLV- n=9). El eje de las ordenadas corresponde a la densidad óptica (DO) de isotipos contra BoHV-1. a) Isotipo IgG1 b) Isotipo IgG2. El eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.3 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BoHV-1

Según se observa en la Tabla 1, tanto animales BLV- como BLV+ desarrollan anticuerpos neutralizantes frente a la primovacunación el día 24, con mayor número de animales que respondieron luego del *booster* el día 36. El título de anticuerpos protectores luego del tercer sangrado en todos los casos disminuyó hacia el día 60. A pesar de ello, no existieron diferencias significativas entre los grupos conformados, en ninguno de los sangrados. Esto se puede expresar más gráficamente tal como se indica en la figura 3. En comparación con el día 0, en ambos grupos hay una diferencia significativa recién a partir del día 24 pv, haciéndose más evidente el día 36 pv ($p<0,000001$), donde alcanza títulos máximos. Esto demuestra la eficacia del *booster* proporcionado el día 24, que induce la mayor respuesta. La disminución que se observa entre el día 36 y 60 pv no es significativa.

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

Grupo	Día 0	Día 7	Día 24	Día 36	Día 60
BLV- n=9	#0	#0	#2 1(0), 1(1/2), 1(1/4), 1(1/6), 2 (1/8), 1(1/12), **1(1/16), 1(1/24)**	#8 **1(1/6), 1(1/64), 5(1/128), 1(1/192) 1(1/256)**	#8 1(1/8), **2(1/16), 1(1/32), 1(1/64), 1(1/96), 2(1/128), 1(1/192)**
BLV+ n=15	#0	#0	#2 3(0), 1(1/3), 1(1/4), 2(1/6), 4(1/8), 2(1/12), **1(1/16), 1(1/32)**	#14 **1(0), 1(1/64), 3(1/96), 3(1/128), 4(1/192), 3(1/256),**	#13 1(1/6), **1(1/16), 1(1/32), 2(1/48), 3(1/64), 3(1/96), 3(1/128)**

BLV+ (animales positivos al virus de la leucosis bovina); BLV- (animales negativos al virus de la leucosis bovina). Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

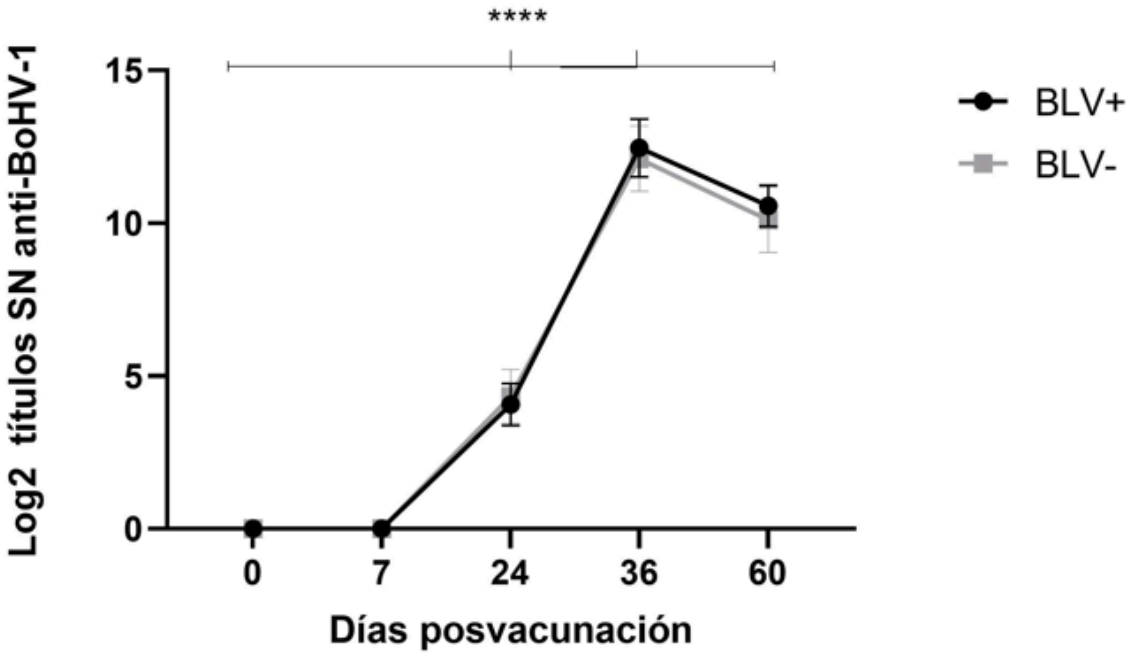


Figura 3. *Cinética del título de anticuerpos neutralizantes contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados según estado para BLV, mediante SN in vitro a lo largo del ensayo.*

Animales positivos a BLV en círculos negros (BLV+ n=15), animales negativos a BLV en cuadrados grises (BLV- n=9). El eje de las ordenadas corresponde al logaritmo en base 2 de títulos de anticuerpos seroneutralizantes contra BoHV-1. El eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.4 ANTICUERPOS TOTALES CONTRA BVDV

En referencia a los anticuerpos generados contra BVDV, no hubo diferencias significativas por día entre grupos. Entre el día 24 y 36 pv encontramos una diferencia significativa en ambos grupos, sin embargo, en comparación con el día 0, el único grupo que muestra una diferencia significativa es el BLV+ (p=0,003536). A su vez, podemos observar que en general el grupo de estudio no respondió bien a la vacuna, ya que los títulos nunca sobrepasan el punto de corte establecido en el Kit. A su vez, también se realizó ELISA p80 para confirmar que los títulos de anticuerpos observados correspondiesen únicamente a la vacuna, indicando que no había circulación viral.

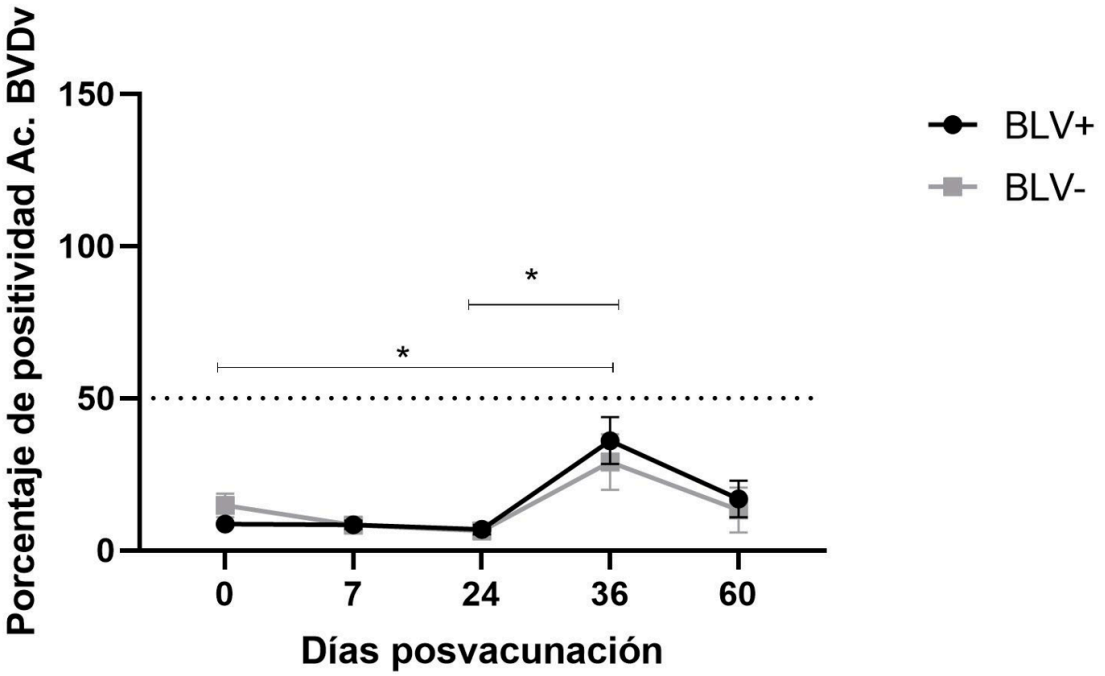


Figura 4. *Cinética del título de anticuerpos totales contra el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en animales vacunados según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo.*

Animales positivos a BLV en círculos negros (BLV+ n=15), animales negativos a BLV en cuadrados grises (BLV- n=9). El eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de positividad de anticuerpos contra BVDV; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.5 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA BVDV

Se realizó Seroneutralización *in vitro* en cada uno de los sangrados del ensayo (día 0, 7, 24 y 36). Observamos que al día 0, la mayoría presentó títulos de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1/8, lo que no coincide con los datos obtenidos del ELISA. Las células fueron chequeadas por presencia de *Mycoplasma spp* y BVDV pero el resultado fue negativo. A su vez, se observan títulos altos el día 24 y 60, otro dato que no concuerda con los resultados obtenidos ya que mediante ELISA no se observaron valores elevados.

Tabla 2: Título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1:16 contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en cada sangrado post-vacunación y según estado para BLV, mediante Seroneutralización in vitro

Grupo	Día 0	Día 7	Día 24	Día 36	Día 60
BLV- n=9	#9 **9(>1/8)**	#9 **9(>1/8)**	#7 2(1/8), **4(1/16), 2(1/64), 1(1/128)**	#2 4(1/4), 3(1/8), **2(1/16)**	#7 2(1/8), **2(1/16), 4(1/32), 1(1/64)**
BLV+ n=15	#9 2(1/2), 2(1/4), 2(1/8), **9(>1/8)**	#13 2(1/2), **13(>1/8)**	#11 2(1/2), 2(1/8), **4(1/16), 6(1/32), 1(1/64)**	#4 2(1/2), 1(1/4), 8(1/8), **4(1/16)**	#9 2(1/4), 3(1/8), **1(1/16), 5(1/32), 3(1/64)**

BLV+ (animales positivos al virus de la leucosis bovina); BLV- (animales negativos al virus de la leucosis bovina). Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

9.6 CARGA PROVIRAL DE BLV

Se realizó mediante ddPCR la cuantificación de la carga proviral de 7 animales positivos a BLV el día 0 y 60 del estudio (Figura 5b). Tres de estos fueron catalogados como de alta carga proviral (HPL) y 4 como de baja carga proviral (LPL) según la cantidad de copias por nanogramo (De Brun et al., 2023)

En base a esta clasificación, se analizaron los resultados obtenidos en los estudios anteriores y se compararon los resultados de carga con los resultados de anticuerpos producidos por las vacunas sin encontrar diferencias significativas entre los grupos (figura 6). No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los estudios entre animales HPL y LPL.

a)

b)

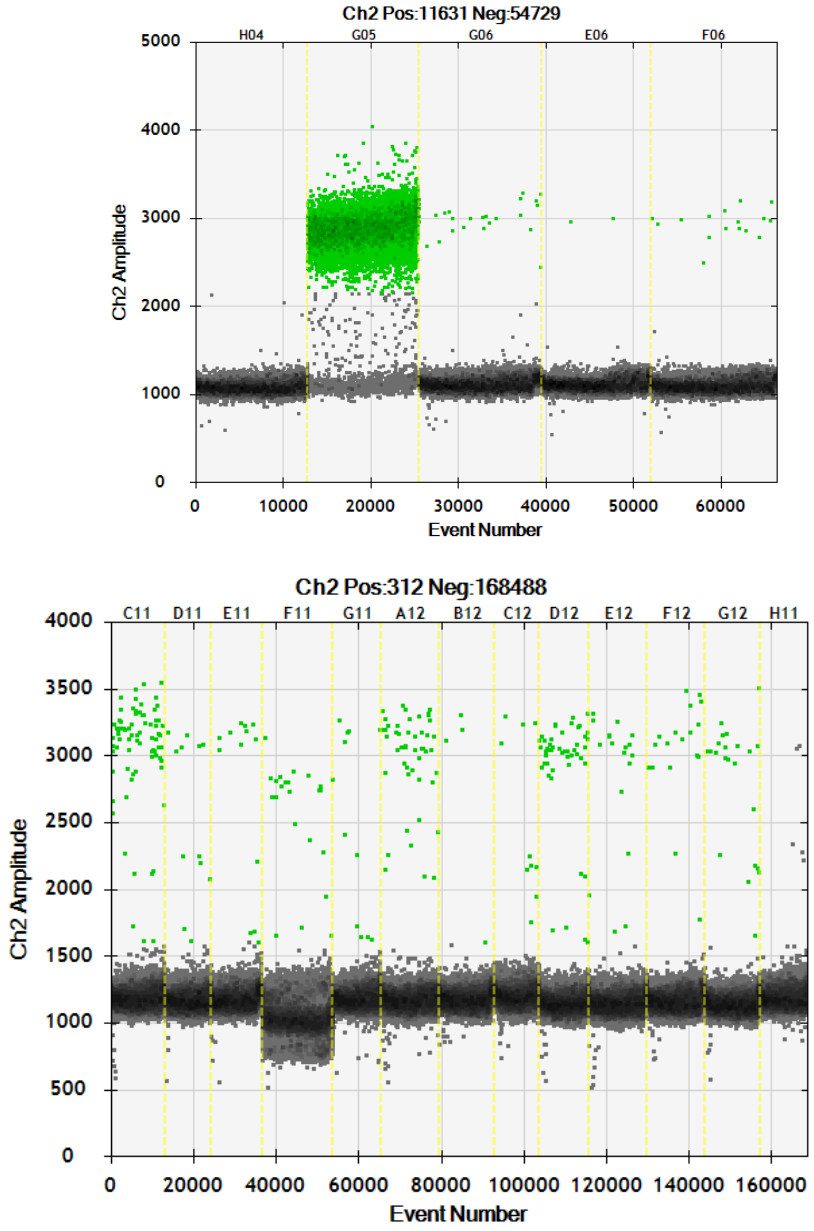


Figura 5. *Salida del programa de ddPCR para carga proviral de BLV*
a)Corrida de prueba testeando H04: ntc, G05: plásmido, G06: control positivo, E06: vaca7059d0, F06: vaca7059d60. Verde=eventos positivos; gris=eventos negativos. b)Corrida del ensayo con muestras problema al día 0 y 60. Verde=eventos positivos; gris=eventos negativos.

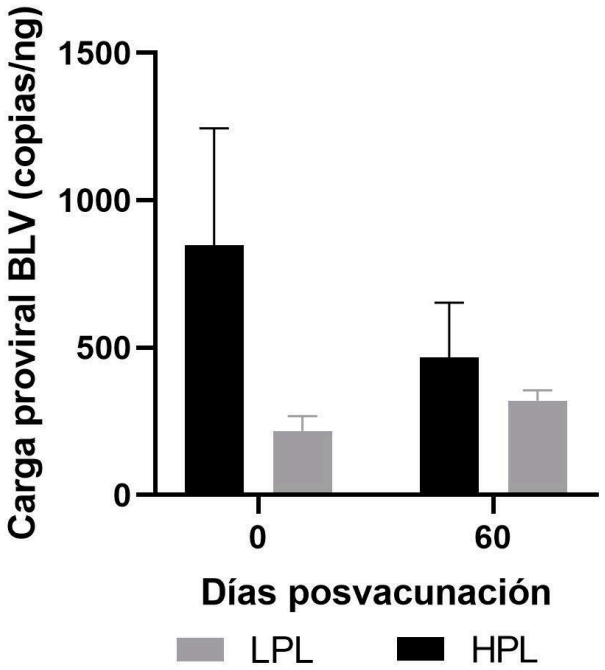


Figura 6. *Carga proviral de BLV expresada en copias por nanogramo (copias/ng) de ADN, mediante ddPCR al día 0 y 60 del ensayo.*

Animales de alta carga (HPL) en barras negras (n=3), animales de baja carga (LPL) en barras grises (n=4). El eje de las ordenadas corresponde a la carga proviral de BLV; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial.

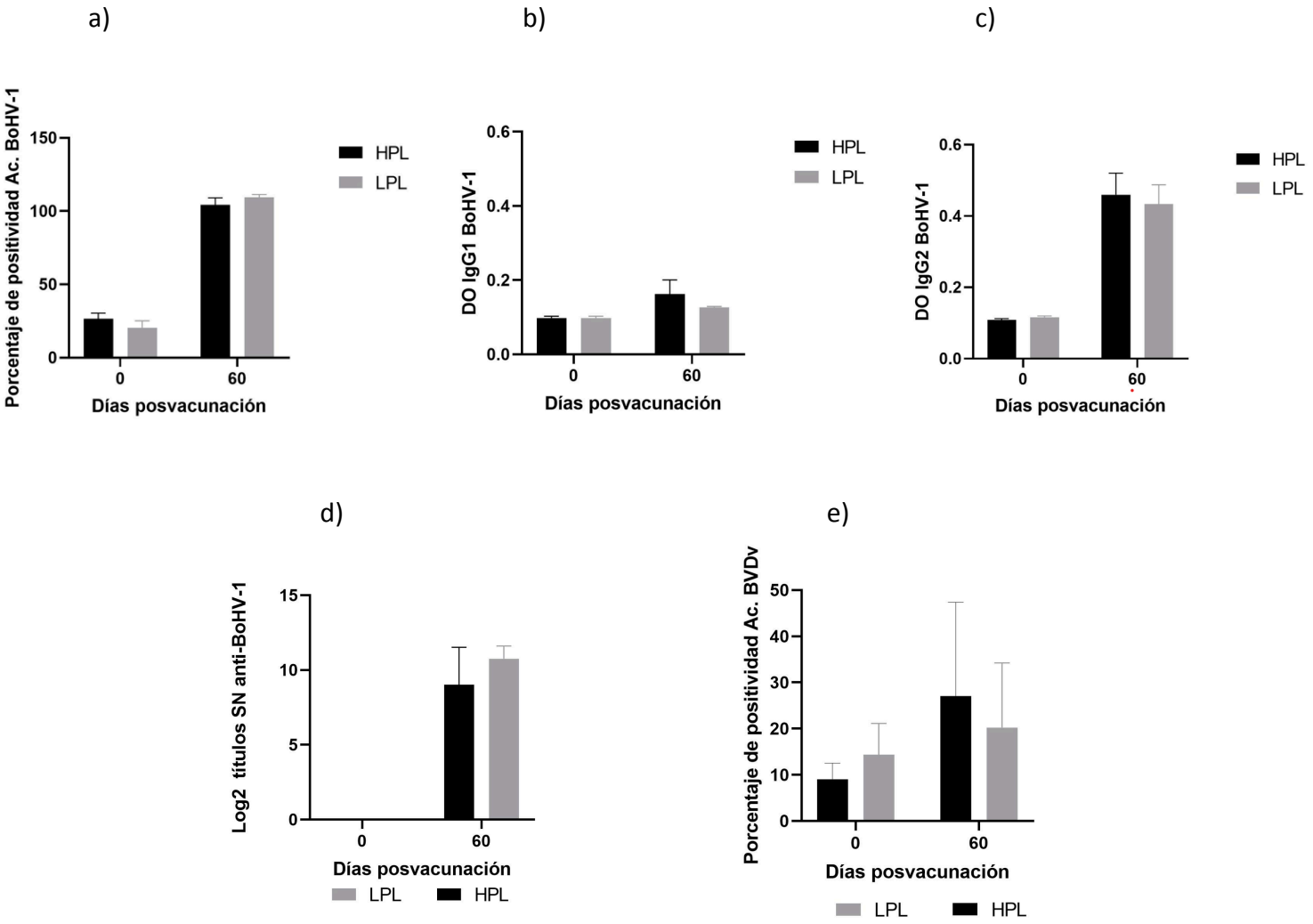


Figura 7. *Título de anticuerpos contra BoHV-1 y BVDV en animales vacunados según carga proviral de BLV, los días 0 y 60 del estudio.*

Animales de alta carga (HPL) en barras negras (n=3), animales de baja carga (LPL) en barras grises (n=4). a) ELISA anticuerpos totales BoHV-1 b) ELISA isotipo IgG1 c) ELISA isotipo IgG2 d) SN *in vitro* BoHV-1 e) ELISA anticuerpos totales BVDV. El eje de las ordenadas corresponde al nivel de anticuerpos contra las virosis mencionadas; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial.

9.7 PUESTA A PUNTO CITOMETRÍA DE FLUJO

9.7.1 *MARCACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B*

Se realizaron titulaciones de anticuerpos para la detección de poblaciones de linfocitos. En cuanto a la titulación de anticuerpos para la marcación de linfocitos T podemos decir que la dilución apropiada para CD4-RPE fue de 1:5, mientras que la de CD8-Alexa 647 fue de 1:10 (figura 7). En la figura 8 se observan las poblaciones bien distinguidas en el histograma.
Para la población de células B se eligieron los títulos de 1:50 para CD21(FITC) (figura 9) y 1:20 para CD40 (FITC) (figura 10)

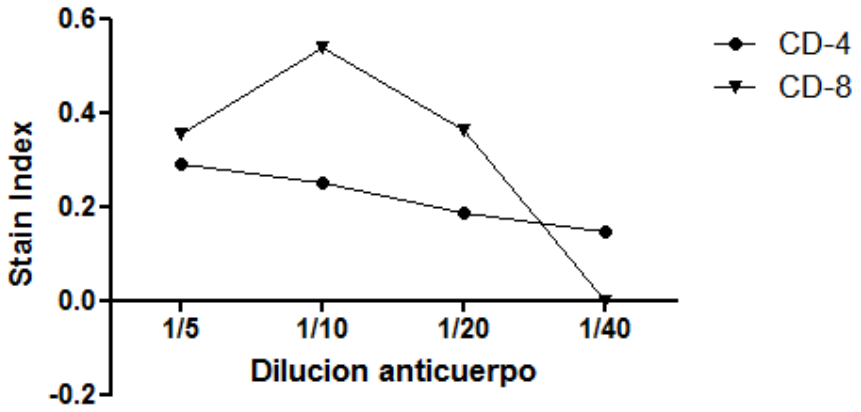


Figura 8. *Determinación del Stain Index para CD4 y CD8*
El eje de las ordenadas corresponde a la dilución de anticuerpos; el eje de las abscisas corresponde al índice de tinción. En círculos CD4; en triángulos CD8.

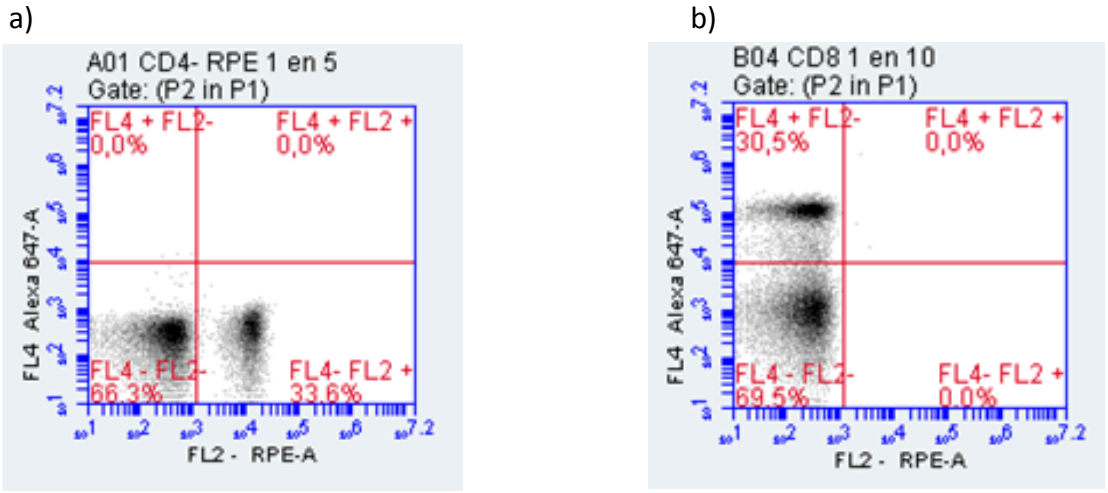


Figura 9. *Histograma de lectura por citometría de flujo para poblaciones de linfocitos CD4 y CD8*
El eje de las ordenadas corresponde a FL2 CD4-RPE; el eje de las abscisas corresponde FL4 CD8-Alexa647.

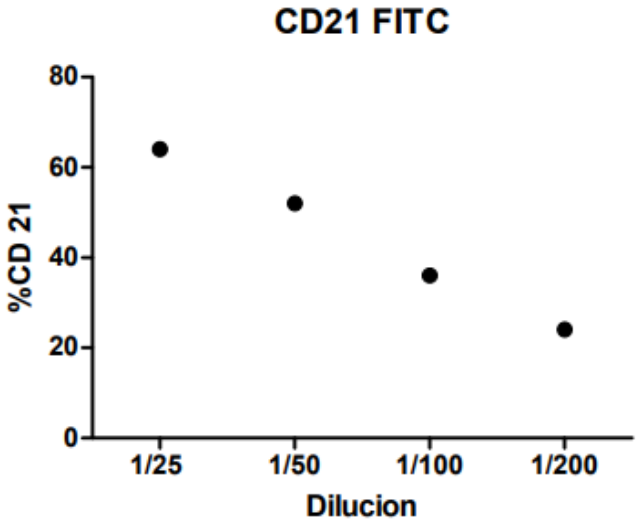


Figura 10. *Determinación del Stain Index para CD21*
El eje de las ordenadas corresponde a la dilución de anticuerpos; el eje de las abscisas corresponde al índice de tinción.

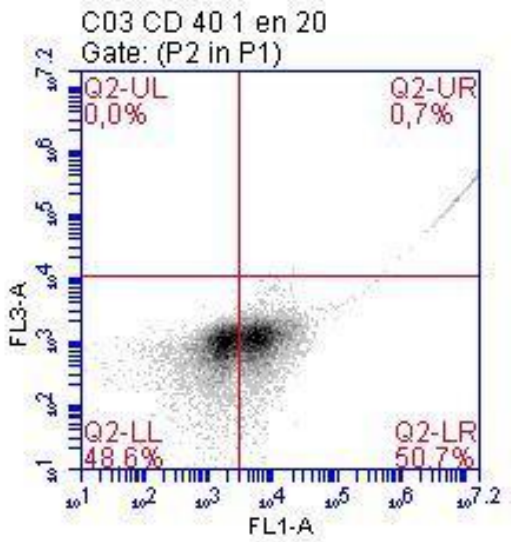


Figura 11. *Histograma de lectura por citometría de flujo para poblaciones de linfocitos CD40*
El eje de las ordenadas corresponde a FL1 CD40-FITC; el eje de las abscisas corresponde a FL3.

9.7.2 *MARCACIÓN DE CITOQUINAS*

Del ensayo de marcación de las citoquinas producidas, seleccionamos 1:5 para IL-4 (FITC) y 1:10 para IFN (Alexa 647) (figura 12)

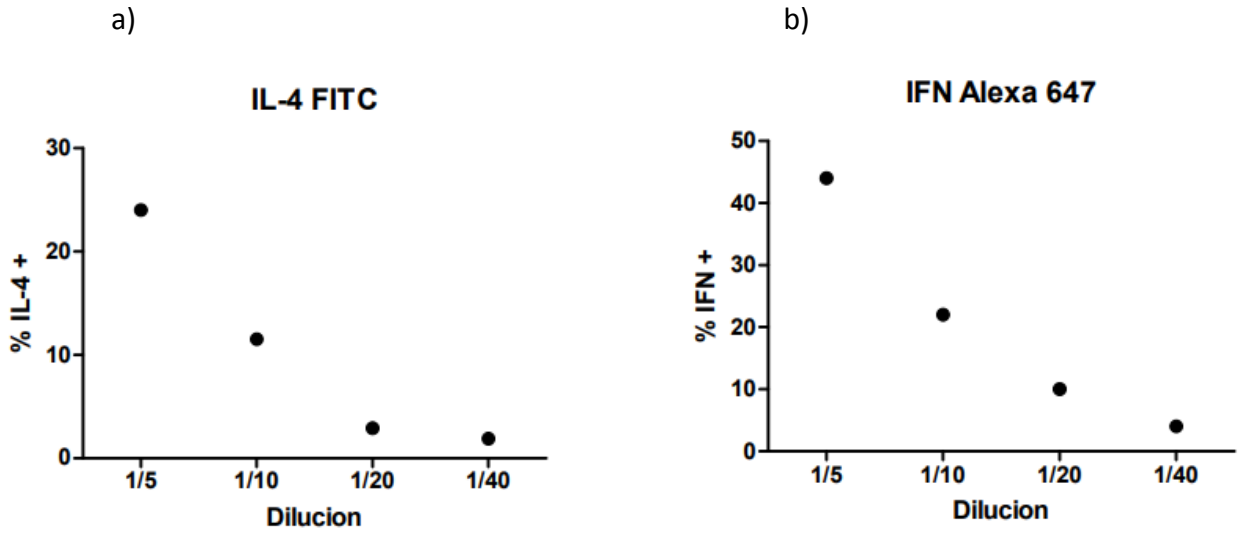


Figura 12. *Determinación del Stain Index para citoquinas IL-4-FITC e IFN-Alexa647*

a)IL-4-FITC; b)IFN-Alexa647. El eje de las ordenadas corresponde a la dilución de anticuerpos; el eje de las abscisas corresponde al índice de tinción.

9.7.3 *ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON Ki67*

Sobre el ensayo de proliferación con Ki67, utilizamos la muestra al día 36 de una ternera BLV+ y una ternera BLV-. Las células fueron estimuladas con el mitógeno ConA, BVDV (MOI 1) y BoHV-1 (MOI 1). Testeamos la proliferación resultante para las poblaciones de CD4 y CD8 y para la producción de INF γ. Como resultado, para la muestra BLV+ no se observa proliferación para CD4, CD8 ni producción de INF γ, ya sea en presencia del virus o de la ConA (Figuras 13, 14 y 15). Para la muestra negativa, tampoco se observan diferencias en las poblaciones de CD4 y CD8 (Figuras 16 y 17), pero sí se ve una producción de INF γ con el estímulo de Con A (Figura 18)

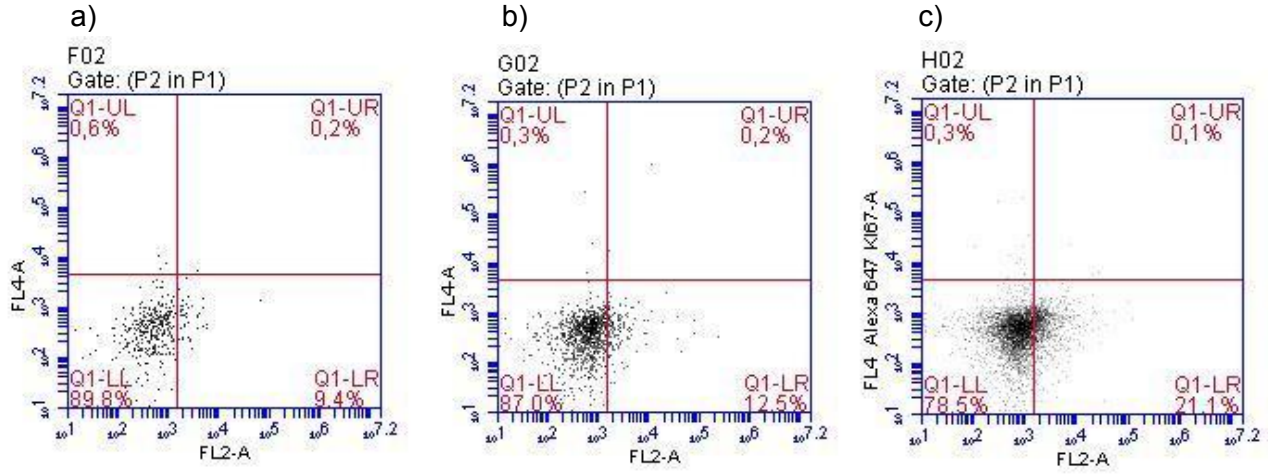


Figura 13. *Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD4 BLV+*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

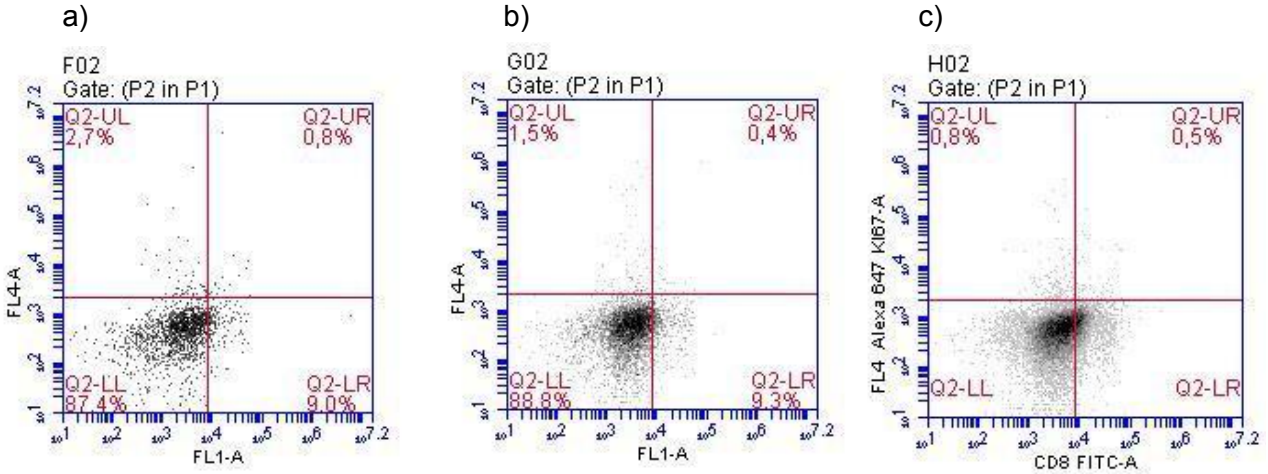


Figura 14. *Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD8 BLV+*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

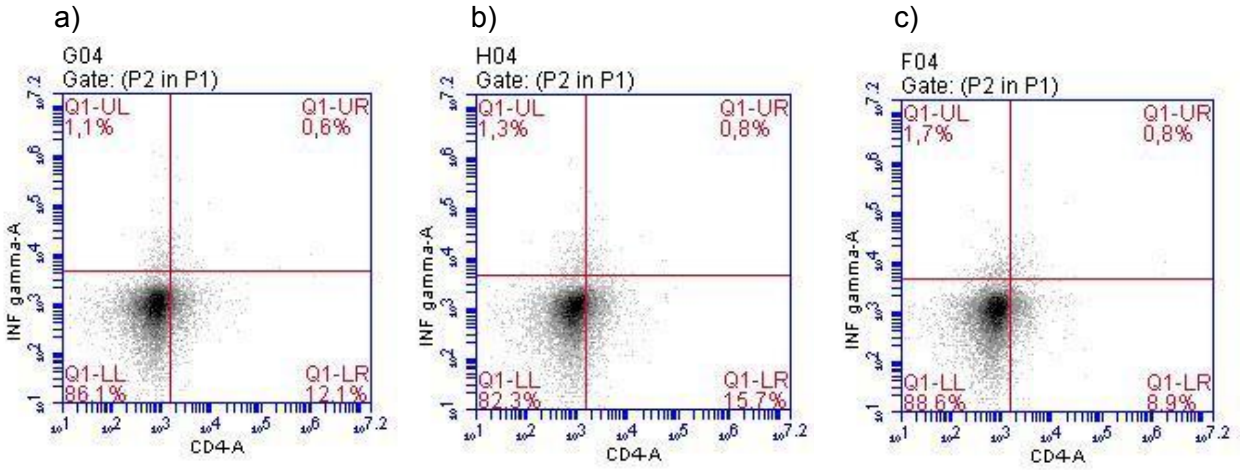


Figura 15. *Histograma de lectura por citometría de flujo para INF gamma BLV+*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

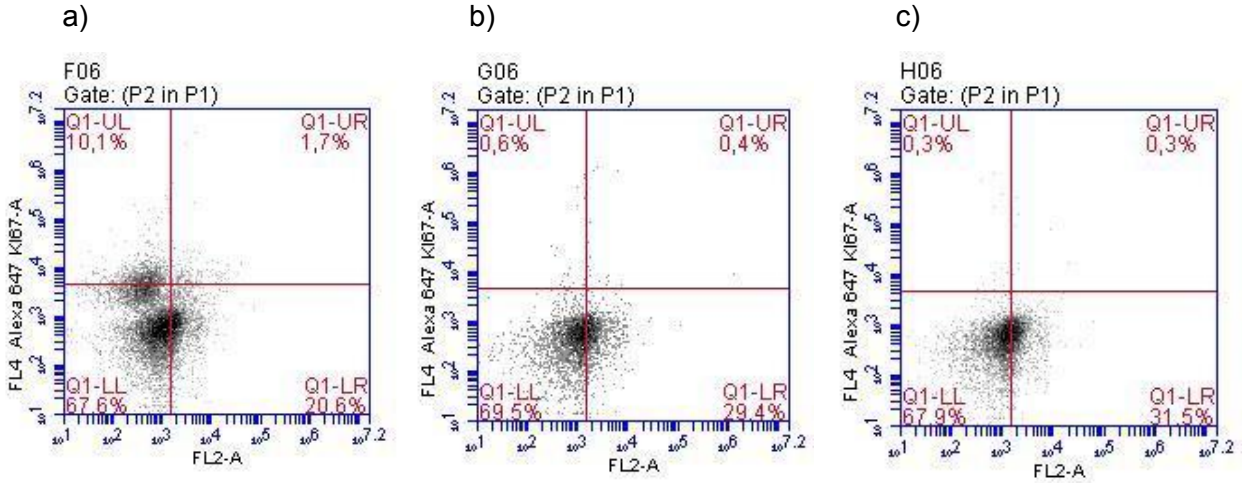


Figura 16. *Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD4 BLV-*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

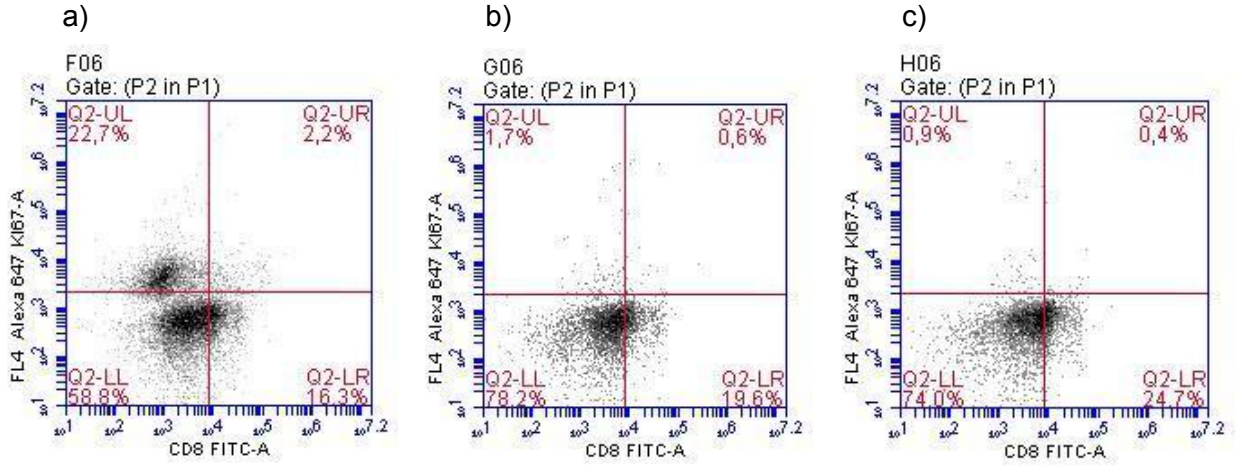


Figura 17. *Histograma de lectura por citometría de flujo para linfocitos CD8 BLV-*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

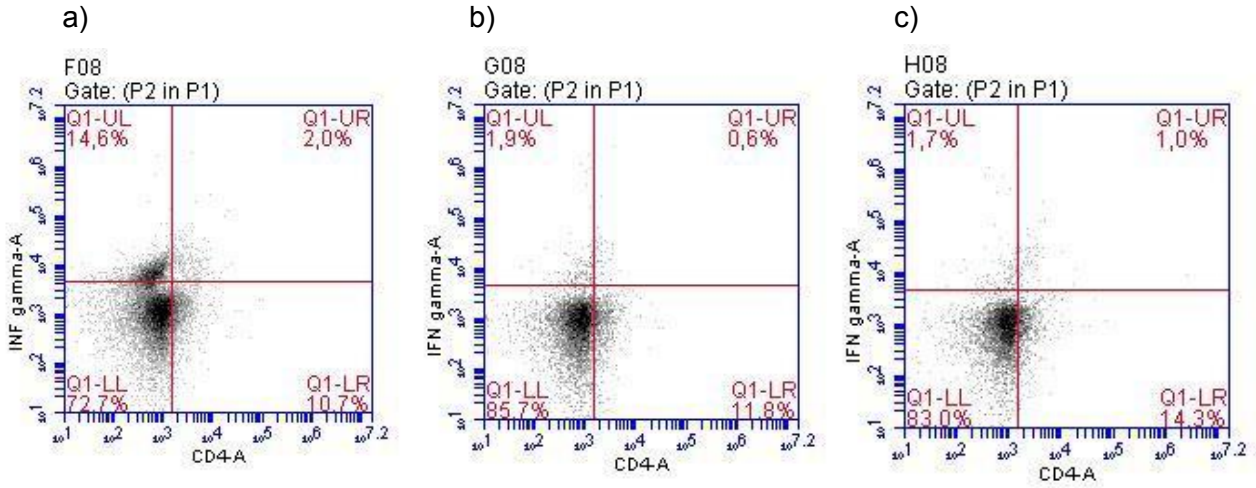


Figura 18. *Histograma de lectura por citometría de flujo para INF gamma BLV-*
a)linfocitos estimulados con ConA; b)linfocitos estimulados con BVDV MOI 1; c)linfocitos estimulados con BoHV-1 MOI 1.

10. DISCUSIÓN

BLV representa la principal virosis que afecta a los rodeos lecheros en nuestro país. Se estima que el 90% de los animales infectados no presentan síntomas, siendo el 60% aleucémicos y el 30% con linfocitosis persistente (LP). Esta situación conlleva a pérdidas productivas, principalmente asociadas a la limitación en la exportación de animales en pie, la disminución de la producción láctea y la reducción de la longevidad de los animales (Bartlett et al., 2013; Bartlett et al., 2014). A su vez, también se ha comprobado que la infección por este retrovirus provoca alteraciones en el sistema inmune, tanto en la inmunidad celular como humoral (Gillet et al., 2007; Frie & Coussens, 2015; Blagitz et al., 2017), aunque aún no se ha determinado el impacto económico asociado a estos efectos.

En base a esto, se ha determinado que existe un incremento muy importante en la población de linfocitos B, con disminución en los porcentajes tanto de linfocitos T CD4+ como T CD8+ (Nieto Farias et al., 2018). A pesar de que el linfosarcoma ocurra en una proporción pequeña del ganado infectado con BLV, el virus puede tener efectos más sutiles sobre la salud del rodeo, incluso teniendo impacto sobre los programas de vacunación (Erskine et al., 2011; Puentes, et al., 2016a; Frie et al., 2016). Vinculado a ello, en esta tesis se buscó determinar si las terneras BLV- y BLV+ eran capaces de generar una respuesta inmune diferencial frente a la administración de una vacuna comercial contra BoHV-1 y BVDV, ambos patógenos virales ampliamente distribuidos, y con gran impacto productivo y reproductivo en la producción lechera a nivel local y mundial (Muylkens et al., 2007; Guarino et al., 2008; Richter et al., 2017).

La prevalencia serológica del virus en este rodeo fue de 64% al inicio del estudio, lo que coincide con datos obtenidos por Riet Correa et al. (2019) en el cual se encontró que tambos pequeños (1 a 50 vacas) la seroprevalencia era de 65%. Sin embargo, es importante destacar que en esta tesis se utilizaron animales jóvenes (6 meses), lo que difiere del ensayo previamente mencionado que involucraba animales en producción. Sin embargo, un estudio realizado por Puentes et al. (2016) con la misma categoría que nuestro ensayo, obtuvo seroprevalencias de 45% en un lote que ingresaba a un campo de recría. Por lo que el tambo de nuestro estudio presenta una seroprevalencia por encima de esos resultados previamente publicados. Esto puede estar vinculado a la alta prevalencia a nivel de rodeo que predispone que la enfermedad aparezca a edades más tempranas (Gutiérrez et al., 2011; Ruiz et al., 2018). A su vez, puede relacionarse con un estudio realizado por Gutierrez et al. (2014b) en el cual se establece que los terneros infectados durante la primera semana de vida podrían desempeñar un papel activo en la propagación temprana del BLV a animales susceptibles, y más aún si se tiene en cuenta la carga proviral. Los datos recientes sugieren que los niveles de carga proviral en sangre entera (PVL) en vacas infectadas con BLV podrían servir como indicador de la progresión de la enfermedad en el campo (Kobayashi et al., 2019). Estudios anteriores han informado que los niveles de PVL en sangre entera de ganado con linfocitosis persistente eran significativamente más altos que los del ganado asintomático infectado con BLV. Sin embargo, el ganado asintomático infectado con BLV mostró una amplia variabilidad en los niveles de PVL (Panei et al., 2013).

Por otro lado, estudios han demostrado que los animales con HPL son una importante fuente de infección en el rodeo (Mekata et al., 2015), por lo que se propone como estrategia de control, separar a los animales según este parámetro y así evitar la infección en animales menores de dos años, período en el cual hay más tasa de contagio (Merlini et al., 2016). A su vez, estudios demuestran que la carga PVL también influye en lo que es la población de células T, donde los animales con HPL muestran un perfil reducido tanto en linfocitos CD4 como en los CD8 (Nieto Farias et al., 2018), lo que conllevaría a una disminución en la efectividad de la respuesta inmune frente a un estímulo como la vacunación. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas. Esto puede deberse a que los animales que se estudiaron tenían 6 meses, lo que puede significar que en los animales

catalogados como HPL las infecciones hayan sido recientes, y que la carga proviral no esté aún establecida. Además las variaciones existentes en relación al poco número de animales debido a costos económicos y procesamiento de muestras también colabora en este sentido.

La proliferación celular es un indicador comúnmente medido de la función de las células T. Soares et al (2010) evaluaron la expresión intracelular de Ki67 como marcador de la proliferación *in vitro* en ensayos con sangre completa o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) demostrando un enfoque alternativo para medir la proliferación de células T impulsada por antígenos, y encontraron que los resultados obtenidos fueron muy similares a los generados por sistemas de ensayo de proliferación comúnmente utilizados. El desarrollo de tintes fluorescentes y marcadores de seguimiento ha permitido el análisis combinado de la proliferación de células T específicas de antígenos, la fenotipificación y la expresión de citoquinas mediante citometría de flujo (Johannisson y Festin, 1995; Mehta y Maino, 1997; Wallace et al., 2008). Mediante esta técnica, se puede explicar con más detalle la variación en las poblaciones celulares. Es sabido que en las primeras etapas de la infección por BLV, los animales exhiben una respuesta celular predominantemente mediada por linfocitos T helper 1 (Th1), que producen IL-2, IL-12 e IFN-γ. Con la progresión de la enfermedad, se observan cambios hacia una respuesta T helper 2 (Th2), con un aumento en las poblaciones de linfocitos B y una disminución en los porcentajes de linfocitos T CD4+ y T CD8+. También se reduce la expresión de citoquinas de tipo 1 en los linfocitos T CD4+ y se alteran los perfiles de citoquinas en todas las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica, destacando aumentos de IL10 e IL4, y disminuciones de IL-2, IL-12 e IFN-γ. Además, se ha observado que la progresión de la infección interrumpe la homeostasis de la proliferación y la muerte celular en células B y T (Kabeya et al., 2001; Sordillo et al., 1994; Puentes et al., 2016).

Sobre la puesta a punto de la citometría, pudimos establecer las concentraciones adecuadas para la marcación de linfocitos y citoquinas. A su vez, empleamos la proliferación in vitro de linfocitos como método para evaluar la respuesta inmunológica. Esta proliferación es esencial en una respuesta inmunitaria efectiva para desarrollar linfocitos efectores y de memoria, ambos necesarios para eliminar un antígeno actual y garantizar que las respuestas futuras al antígeno sean más rápidas y robustas que el encuentro inicial (Desforges et al., 2016). En este estudio, evaluamos la proliferación de linfocitos sanguíneos mediante la medición de la expresión de Ki67, ensayo más adecuado para el estudio de proliferación de células mononucleares en bovinos (Souza et al., 2023). Los resultados obtenidos frente a los estímulos virales y frente al mitógeno utilizado como control fueron negativos, ya que no observamos proliferación de linfocitos CD4 ni CD8, y tampoco producción de INF γ. Sin embargo, en la muestra BLV- se pudo observar una población positiva para KI67. Esta población puede ser resultado de un marcaje no específico de células T, ya que estudios recientes han reportado que la concanavalina-A (Con-A) puede ser mitogénica tanto para los linfocitos T como para los linfocitos B, mientras la fitohemaglutinina (PHA-M) actúa como un mitógeno específico para los linfocitos T (Souza et al., 2023). En suma, la técnica de evaluación de la respuesta inmune celular por citometría de flujo, fue protocolizada en el laboratorio de la Unidad de Microbiología para bovinos, y si bien es una técnica prometedora, no es una técnica práctica para la evaluación a nivel de producción pero sí a niveles de investigación, donde se continuará profundizando en la misma.

En cuanto a BoHV-1, este virus es conocido por generar una enfermedad respiratoria grave como la IBR y también representa la principal causa de abortos de origen viral en bovinos a nivel mundial. A su vez, debido a la depresión que este virus genera en el sistema inmune, junto con el daño generado a la mucosa hace que sea un patógeno importante del complejo respiratorio bovino, la enfermedad respiratoria más importante en la recría de animales (Jones, 2019). Todo eso deriva en considerables pérdidas económicas en la industria

ganadera (Muylkens et al., 2007). En Uruguay, la infección con este virus está ampliamente extendida. La cuantificación de la respuesta inmune humoral es el método más empleado para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas utilizadas en animales. Teniendo en cuenta esto, la respuesta a la vacunación, independientemente del estatus inmunológico frente a BLV, la aplicación de una doble dosis de inmunización generó, según los resultados obtenidos, una seroconversión de 95,8% (24/25) al día 36pv y 91,6% al día 60pv, con títulos considerados aceptables para garantizar protección (iguales o superiores a 1/16) (Pospísil et al., 1996). En un estudio conducido por Silva et al. (Silva et al., 2007), de las seis vacunas comerciales contra el BoHV-1 evaluadas, dos de origen uruguayo generaron títulos de anticuerpos neutralizantes compatibles en todos los animales (títulos > 1/2), pero al considerar títulos protectores (iguales o superiores a 1/16), como en nuestro estudio, la respuesta disminuyó a un 67% (6/9) en una vacuna y al 18% (2/9) en la otra. Sin embargo, en nuestro ensayo, al considerar títulos de 1/2, los porcentajes de animales con resultados positivos fueron de 100%. Del mismo modo que la eficacia de las vacunas contra BoHV-1 se ha estimado mediante la determinación de los títulos de anticuerpos neutralizantes *in vitro* obtenidos luego de la vacunación. Anziliero et al. (2015), en sus investigaciones, concluyeron que, con excepción de dos vacunas que indujeron seroconversión en 8/10 y 9/10 animales, los demás productos utilizados generaron anticuerpos neutralizantes contra el BoHV-1 en todos los animales vacunados, con títulos protectores aceptables. Los datos obtenidos en este estudio son relevantes, ya que están descritos los beneficios que la inclusión de la vacunación tiene en los programas de salud en los establecimientos ganaderos, ya sea con vacunas virales vivas modificadas o inactivadas contra el BoHV-1 Newcomer et al. (2017b). En este contexto, es crucial resaltar en este estudio la importancia de la activación inicial del sistema inmune, evidenciada a los 24 días pv tras la primera dosis. Posteriormente, con la segunda inmunización, se observaron niveles aún más elevados de anticuerpos (día 36pv), lo que sugiere la capacidad de los animales para desencadenar una respuesta inmunitaria rápida y efectiva ante una posible re-exposición al virus. A pesar de que al día 60 pv, se registra una disminución en los títulos totales de anticuerpos, estos no descienden por debajo del límite considerado como protector. Aunque la dinámica de la respuesta inmunológica después de este periodo no se registró, no se descarta la posibilidad de que se establezca una meseta en la protección conferida por la vacuna, lo cual sería deseable para mantener la eficacia a largo plazo. En este sentido, podría haber sido pertinente realizar muestreos adicionales en momentos posteriores para comprender mejor la evolución de la respuesta inmune.

A pesar de observarse una respuesta satisfactoria a la vacunación en todos los casos, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos BLV+ y BLV-, tanto en términos de anticuerpos neutralizantes como totales, en ninguno de los momentos de muestreo. En este sentido, esto se contradice con estudios que han demostrado que el ganado infectado con BLV desarrolla una respuesta de anticuerpos defectuosa frente a desafíos específicos, con mecanismos de supresión inmunológica que afectan tanto la vía humoral como la celular (Sordillo et al., 1994; Frie et al. 2016). Sin embargo, las diferencias pueden deberse al tamaño del grupo de estudio, la edad de los animales y el protocolo de vacunación. El hecho de que no se hayan observado diferencias en los niveles de anticuerpos totales coincide con un estudio realizado previamente por nuestro grupo de trabajo, en el cual se evaluó la respuesta serológica de animales BLV+ frente a la vacunación contra el virus de la fiebre aftosa (Puentes et al., 2016). Sin embargo, de este estudio se desprende que el perfil específico de respuesta a la vacunación puede darnos otro tipo de información relevante, ya que la inducción de isotipos específicos de respuesta inmune favorece el desarrollo de mecanismos efectores, desempeñando un papel crucial en la vacunación. La medición de los niveles de IgG1 e IgG2 específicos contra BoHV-1 en suero, permite conocer de forma indirecta la respuesta celular inducida luego de la vacunación. Es así que altos títulos de IgG1 están relacionados a una respuesta con un perfil Th2, mientras que altos niveles de IgG2 están relacionados a un perfil Th1 (Heriazon et al., 2011; Spilki et al., 2012). Por otro lado, cuando en estudios anteriores se relacionaron los niveles de IgG2 e IgG1 con la

reducción de la excreción viral, se observó que independientemente del adyuvante utilizado en las vacunas, los animales que tenían al momento del desafío viral niveles de la relación IgG2/IgG1 mayor a 1 fueron los animales que presentaron menor número de excreción viral (Romera, 2001). Frie et al. (2016) señalan que, después de la vacunación contra el BoHV-1, los bovinos BLV+ presentaron títulos más bajos de anticuerpos, especialmente de IgG2, en comparación con el ganado libre de BLV. Esto es consistente con el estudio realizado por Erskine et al. (2011), en el cual el ganado libre de BLV y vacunado contra la bacterina J5 de *E.coli* produjo una cantidad significativamente mayor de IgG2 sérica específica de antígeno, en comparación con los animales infectados con el retrovirus. En el presente estudio, el isotipo predominante fue el IgG2, existiendo una pobre respuesta a la IgG1. Estos altos títulos de IgG2 coinciden con los resultados obtenidos en el trabajo de Leites et al., (2019). A su vez, los niveles altos de IgG2 pueden explicar por qué no existieron diferencias significativas en el análisis de los títulos de anticuerpos totales. Al evaluar la IgG1, se observó que el grupo BLV- presentó un leve incremento en el título numéricamente superior a los animales BLV+, hacia el día 36 pv, sin que lleguen a ser valores significativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el día 24 y 36pv en ningún grupo, lo que indica que el *booster* no fue eficaz, al menos en los niveles detectables de anticuerpos. La ausencia de diferencias significativas podría atribuirse al limitado número de animales en el estudio y a un aumento de variabilidad entre animales. Por otro lado, Frie et al. (2017) no encontraron en su estudio diferencias en la producción de IgG1 e IgG2, pero sí una menor producción de IgM en vacas BLV+ frente a una estimulación inmune primaria con el antígeno purificado “keyhole limpet hemocyanin” (KLH). Sin embargo, a nivel de poblaciones celulares, pudo verse que las células T de vacas BLV+ mostraron una mayor respuesta a la estimulación *in vitro* pero no se observaron diferencias en la activación de células T CD4+ o T CD8+. Finalmente, las células B de vacas BLV+ exhibieron mayor expresión de CD25 y expresión de MHCII reducida en respuesta a la estimulación *in vitro*. Esto apoya la hipótesis de que las vacas BLV+ responden diferente a la vacunación comparando con animales BLV- (Frie y col., 2016). En contraste, en nuestro trabajo no se encontraron diferencias significativas en el isotipo IgG2 anti BoHV-1 en terneras en la recría, no pudiéndose determinar en el isotipo IgG1 debido a una pobre respuesta de la vacuna al mismo.

Por otro lado, conjuntamente con BoHV-1, el BVDV es otro de los virus que genera gran impacto en la salud productiva y reproductiva del ganado de nuestro país, causando importantes pérdidas asociadas a enfermedades y mortalidad. La seroprevalencia del virus en los rodeos de Uruguay ha sido del 100% (Guarino et al., 2008; Repiso et al., 2005), con predominancia de los subgenotipos BVDV-1a, BVDV-1i y BVDV-2b (Maya et al., 2016). La presencia de animales PI contribuye a estas altas prevalencias al mantener y diseminar el virus sugiriéndose la eliminación de los mismos siguiendo el éxito de planes nacionales obligatorios en países con endemia de BVD. Las estrategias pueden variar según el estatus serológico del rodeo, ya sea utilizando medidas de manejo, vacunación o programas combinados. En Uruguay, se sugiere la posibilidad de implementar un marco legal obligatorio para el control de la BVD, actualmente gestionado de manera voluntaria. Se propone realizar una investigación previa sobre la prevalencia nacional de animales PI y evaluar si es posible llevar a cabo el control obligatorio de la enfermedad. En cuanto al uso de las vacunas, un meta-análisis realizado por Newcomer et al. (2015) indica que la vacunación contra el BVDV reduce los abortos en un 45%, disminuye la tasa de infección fetal en un 85% y aumenta la tasa de preñez en un 5%. Los programas de vacunación de control contra el BVDV implican el uso de diferentes tipos de vacunas vivas atenuadas, muertas y recombinantes (Moennig & Becher, 2018). Si bien tanto las vacunas vivas atenuadas como las vacunas inactivadas pueden prevenir las manifestaciones clínicas de BVDV, existe una diferencia en cuanto a su seguridad para la vacunación en diversas poblaciones de ganado. En este estudio, se empleó una vacuna inactivada (ya que son las únicas habilitadas en el país), que aunque esto redujo los riesgos adversos vinculados a la vacunación, también limitó la capacidad inmunogénica de la vacuna, generando

principalmente anticuerpos dirigidos a proteínas estructurales como E2. A pesar de la aplicación de una doble dosis (día 0 y un refuerzo a día 24), no se lograron niveles adecuados de anticuerpos que sugieren protección en el grupo estudiado. Tampoco hallamos diferencias significativas entre el día 0 y 60 de anticuerpos totales anti proteína E0, lo que demuestra una pobre respuesta a la vacuna, habiendo descartado la presencia de animales PI en el grupo de estudio. Sin embargo, luego del *booster* entre el día 24 y 36 hay una diferencia en ambos grupos, lo que demuestra que hay un intento de estimulación del sistema inmune, aunque sigue estando por debajo del punto de corte. Esto coincide con datos provenientes de países vecinos como Brasil, donde se han realizado estudios que evalúan la respuesta de las vacunas frente BVDV, y los resultados han arrojado una inmunogenicidad prácticamente indetectable generada por estas vacunas, demostrando en un estudio que cuatro vacunas no indujeron respuesta serológica neutralizante contra BVDV-1 en ningún animal, y una de ellas sólo en un animal, y por su parte, cinco vacunas no indujeron anticuerpos contra BVDV-2 en ningún animal, y una de las mismas sólo en dos animales (20%) (Anziliero et al., 2015). Este mismo resultado fue corroborado en el Sector de Virología de la UFSM (Universidade Federal de Santa María, RS, Brasil), donde se evaluaron tres vacunas comerciales contra el BVDV, obteniéndose títulos solo en un pequeño grupo de animales y estos eran bajos (Flores, 2018). Más recientemente, un trabajo realizado por De Brun (2022) comprueba que la prevalencia de este virus en el rodeo estudiado fue de 90%, presentando títulos de anticuerpos al día 0, y que la respuesta inmune generada por la vacuna fue inexistente (utilizando una vacuna de producción nacional en vaquillonas). La utilización de vacunas a virus vivo modificado podría considerarse como una alternativa para abordar esta problemática, ya que estas vacunas tienen la capacidad de estimular de manera más rápida la producción de niveles más altos de anticuerpos, así como la inmunidad mediada por células. Otra alternativa es la utilización de adyuvantes potentes para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas muertas. Estos adyuvantes han demostrado inducir respuestas inmunitarias humoral y mediada por células, proporcionando una mayor eficacia de la vacuna (Sadat et al., 2017). Para equilibrar la seguridad y la inmunogenicidad, se sugiere la administración combinada de vacunas BVD muertas y vivas atenuadas, un enfoque que se ha propuesto para inducir protección reproductiva en vacas (Walz et al., 2017). Otro trabajo reciente informó sobre el desarrollo y la eficacia de la primera vacuna de subunidades dirigidas contra el BVDV (Bellido et al., 2021). La vacuna se basó en la fusión de la proteína estructural E2 del BVDV con un anticuerpo monocatenario para dirigir el antígeno E2 a las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígeno. La vacuna subunitaria desarrollada indujo una respuesta rápida y sostenida de anticuerpos neutralizantes específicos del BVDV en el ganado (Bellido et al., 2021).

Otro método para medir la respuesta inmune frente a BVDV es la Seroneutralización *in vitro.* Tradicionalmente se ha utilizado ya que tiene la capacidad de medir únicamente los anticuerpos capaces de neutralizar al virus. Desafortunadamente, la reproducibilidad de la seroneutralización (SN) es baja, en parte debido a que la SN es un procedimiento técnicamente exigente (Gonda et al. 2012). A su vez, no existe un estándar de referencia internacional para el BVDV, y los resultados de las pruebas SN pueden variar ampliamente según la cepa de virus utilizada, el tipo de célula y las condiciones de la prueba (Edwards 1990). Varios estudios comprueban la correlación entre los resultados que brinda la SN y los hallazgos por ELISA, remarcando la alta sensibilidad y especificidad de esta última. Sin embargo, según los resultados obtenidos en este estudio, mediante SN los animales al día 0 ya presentaban títulos superiores a 1/8, considerados como protectores, a diferencia de los resultados obtenidos por ELISA, y durante el estudio logran generar títulos elevados. En cuanto a la prueba de ELISA es importante tener en cuenta que aporta información sobre la presencia de anticuerpos totales específicos, independientemente de su capacidad neutralizante, por lo que esperaríamos mayor detección mediante esta técnica que por SN, o viceversa, si existen títulos seroneutralizantes indefectiblemente tendrían que ser medidos por el ELISA. La detección de anticuerpos frente al virus BVD por SN y no por ELISA se

podría explicar por la carencia de ciertos epítopes antigénicos en el "kit" comercial utilizado que pudieran estar presentes en la cepa usada en la SN. Es necesario recordar también que en casos de contaminación accidental de cultivos celulares utilizados para la SN con cepas NCP a través del suero fetal utilizado podría generar resultados erróneos en el serodiagnóstico (Reinhardt et al. 2001). Si bien los controles celulares lograban una confluencia en los tiempos previstos, teniendo esto en cuenta, las células fueron testeadas por PCR en búsqueda de BVDV, con resultados negativos. A su vez, conociendo la existencia de otros contaminantes habituales como *Mycoplasma spp* también se realizó la detección mediante PCR. Es sabido que estos causan diversas alteraciones en el metabolismo celular y privan a la célula hospedera de nutrientes esenciales, lo que hace un requisito indispensable estar exentos de su presencia para obtener resultados fidedignos en el laboratorio (Sobarzo 2006). Sin embargo, tampoco detectamos la presencia de este contaminante en nuestros cultivos. Una limitante de la SN es que no permite diferenciar entre la inmunidad humoral por infección y la inducida como respuesta vacunal. Considerando que quizás los animales hayan estado expuestos al virus realizamos un ELISA p80. La proteína p80 del BVDV, es altamente inmunogénica ya que es sintetizada por el virus cuando se replica, lo que sólo ocurre durante la infección (Raue et al., 2011). Estos resultados también fueron negativos. En conclusión, por el momento podemos atribuir que la técnica falló debido a problemas metodológicos o de condiciones de la muestra. Se seguirá investigando al respecto en búsqueda de una respuesta más certera para aclarar este acontecimiento.

11. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio, indican que no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) en anticuerpos totales entre grupos BLV+ y BLV- para BVDV y BoHV-1.

Sin embargo, en la respuesta de isotipos, aquellos animales infectados con BLV mostraron niveles de IgG2 levemente superiores, indicando un perfil Th1, mientras que los que estaban libre de la infección respondieron con mayores niveles de IgG1, lo que es esperable de un perfil Th2 inducido por la vacunación frente a IBR.

En cuanto a BVDV, si bien no se pudo evidenciar la presencia de animales PI, podemos decir que la eficacia de la vacunación es controvertida, ya que según nuestros análisis, en ninguno de los dos grupos se obtuvieron títulos significativos.

Finalmente, sobre la puesta a punto de los protocolos para medir inmunidad celular por citometría de flujo, podemos esperar que esta técnica nos ayude a comprender más sobre los cambios inmunológicos que se dan a nivel de poblaciones celulares con respecto a estas virosis inmunosupresoras y altamente prevalentes en nuestro país.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abdala, A., Alvarez, I., Brossel, H., Calvinho, L., Carignano, H., Franco, L., … Willems, L. (2019). *BLV: lessons on vaccine development. Retrovirology*, 16(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s12977-019-0488-8

Abdalla, E. A., Weigel, K. A., Byrem, T. M., & Rosa, G. J. M. (2016). Short communication: Genetic correlation of bovine leukosis incidence with somatic cell score and milk yield in a US Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2005–2009. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9833

Ackermann, M., & Engels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*, *113*(3-4). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.043

Ackermann, M., & Wyler, R. (1984). The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Veterinary Microbiology*, *9*(1), 53–63. https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90078-6

Aida, Y., Miyasaka, M., Okada, K., Onuma, M., Kogure, S., Suzuki, M., … Ikawa, Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, *50*(11), 1946-1951.

Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M., & Takeshima, S.-N. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328

Aida, Y., Okada, K., & Amanuma, H. (1993). Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Research*, *53*(2), 429–437.

Al-Khaliyfa, M. A., Abuelzein, E. M. E., & Gameel, A. A. (2010). Identification of cattle persistently infected with BVDV by ear-notch testing in Saudi Arabia. *The Veterinary Record*, *167*(17), 660–661. https://doi.org/10.1136/vr.c5270

Al-Kubati, A. A. G., Hussen, J., Kandeel, M., Al-Mubarak, A. I. A., & Hemida, M. G. (2021). Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune

Response, and Vaccines Development. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665128

Alonzo, P. (2010). *Herpesvirus bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo. Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12008/24079

Alonzo, P., Benavidez, U., Isnardi, F., Puentes, R., Carol, H., Clavijo, A., … Maissonave, J. (2002). Caracterización de un herpesvirus, aislado de un ternero, con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria*, *37*(147 - 148), 15–22. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/443

Andoh, K., Nishimori, A., Sakumoto, R., Hayashi, K.-G., & Hatama, S. (2020). The chemokines CCL2 and CXCL10 produced by bovine endometrial epithelial cells induce migration of bovine B lymphocytes, contributing to transuterine transmission of BLV infection. *Veterinary Microbiology*, *242*, 108598. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108598

Anziliero, D., Martins, M., Weiss, M., Monteiro, F. L., Ataide, C. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2015). Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciencia rural* , *45*(1), 58–63. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167

Arainga, M., Takeda, E., & Aida, Y. (2012). Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*, *13*, (1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-121

Babiuk, L. A., den Hurk S, van D. L., & Tikoo, S. K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, *53*(1-2). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01232-1

Babiuk, L. A., Ohmann, H. B., Gifford, G., Czarniecki, C. W., Scialli, V. T., & Hamilton, E. B. (1985). Effect of bovine alpha 1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. *The Journal of General Virology*, *66*(11), 2383–2394.

https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-11-2383

Bachofen, C., Stalder, H., Vogt, H. R., Wegmüller, M., Schweizer M, Zanoni, R., & Peterhans, E. (2013). Bovine Virusdiarrhöe (BVD): von der Biologie zur Bekämpfung. [Bovine viral diarrhea (BVD): from biology to control]. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *126*(11-12), 452–461.

Bacon, L. D. (1987). Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. *Poultry Science*, *66*(5). https://doi.org/10.3382/ps.0660802

Bai, L., Takeshima, S.-N., Isogai, E., Kohara, J., & Aida, Y. (2015). Novel CD8(+) cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine*, *33*(51), 7194–7202. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.128

Bai, L., Yokoyama, K., Watanuki, S., Ishizaki, H., Takeshima, S.-N., & Aida, Y. (2018). Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. *Archives of Virology*, *164*(1), 201–211. https://doi.org/10.1007/s00705-018-4058-5

Baker, J. C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *11*(3), 425-445. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30460-6

Barbosa, V. M., Gondim, C. C., Nasciutti, N. R., Oliveira, P. M., Alfieri, A. A., Fritzen, J. T. T., … Saut, J. P. E. (2019). Fatores de risco associados à infecção viral (BoHV-1 e BVDV) em rebanhos leiteiros mestiços com problemas reprodutivos, no município de Uberlândia, MG. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, *71*(4), 1243–1250. https://doi.org/10.1590/1678-4162-10326

Barez, P.-Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G., … Willems, L. (2015). Recent Advances in BLV Research. *Viruses*, *7*(11). 6080-6088. https://doi.org/10.3390/v7112929

Barrett, D., Parr, M., Fagan, J., Johnson, A., Tratalos, J., Lively, F., … Kenny, D. (2018). Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus 1 (BHV 1), Leptospirosis and Neosporosis, and associated risk factors in 161 Irish beef herds. *BMC*

Veterinary Research, *14*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1324-9

Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., & Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *96*(3), 1591–1597. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5930

Bartlett, P. C., Ruggiero, V. J., Hutchinson, H. C., Droscha, C. J., Norby, B., Sporer, K. R. B., & Taxis, T. M. (2020). Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/pathogens9121058

Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., … Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *244*(8), 914–922. https://doi.org/10.2460/javma.244.8.914

Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians) 25*(1), 6–15. https://doi.org/10.1177/1040638712473103

Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., & Dargatz, D. A. (2017). Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 29*(5), 704–706. https://doi.org/10.1177/1040638717702183

Bellido, D., Baztarrica, J., Rocha, L., Pecora, A., Acosta, M., Escribano, J. M., … Wigdorovitz, A. (2021). A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in guinea pigs and cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(6), 3474–3481. https://doi.org/10.1111/tbed.13952

Bender, A. P., Robison, L. L., Kashmiri, S. V., McClain, K. L., Woods, W. G., Smithson, W. A., … Renier, C. (1988). No involvement of bovine leukemia virus in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Research*, *48*(10),

2919–2922.

Bendixen, H. J. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: leukosis enzootica bovis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *108*(3), 1241–1267. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1963.tb13448.x

Bhudevi, B., & Weinstock, D. (2003). Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *Journal of Virological Methods*, *109*(1). https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00040-5

Bielanski, A., Algire, J., Lalonde, A., & Nadin-Davis, S. (2009). Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, *71*(3). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.015

Bitsch, V. (1978). The P 37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *19*(4). https://doi.org/10.1186/BF03547589

Blagitz, M. G., Souza, F. N., Batista, C. F., Azevedo, L. F. F., Sanchez, E. M. R., Diniz, S. A., … Della Libera, A. M. M. P. (2017). Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Research in Veterinary Science*, *114*, 109–116. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.012

Boelaert, F., Speybroeck, N., de Kruif, A., Aerts, M., Burzykowski, T., Molenberghs, G., & Berkvens, D. L. (2005). Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Preventive Veterinary Medicine*, *69*(3-4). https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.02.010

Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1995). Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *American journal of veterinary research, 56*(6), 755–759.

Bowland, S. L., & Shewen, P. E. (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *The Canadian Veterinary Journal* , *41*(1), , 33–48.

Brackenbury, L. S., Carr, B. V., & Charleston, B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary Microbiology*, *96*(4).

https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.09.004

Bradshaw, B. J., & Edwards, S. (1996). Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody. *Veterinary Microbiology*, *53*(1-2). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01242-4

Brock, K. V. (2003). The persistence of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, *31*(2). https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00029-0

Brock, J., Lange, M., Guelbenzu-Gonzalo, M., Meunier, N., Vaz, A. M., Tratalos, J. A., … Thulke, H.-H. (2020). Epidemiology of age-dependent prevalence of Bovine Herpes Virus Type 1 (BoHV-1) in dairy herds with and without vaccination. *Veterinary Research*, *51*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00842-5

Brodersen, B. W. (2004). Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *20*(1). https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.007

Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J., & Pocock, D. H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Annales de Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research*, *18*(2), 157–166.

Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Jin, D. L., Hudes, M., & Block, G. (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PloS One*, *10*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304

Buehring, G. C., Shen, H., Schwartz, D. A., & Lawson, J. S. (2017). Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PloS One*, *12*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367

Burgstaller, J., Obritzhauser, W., Kuchling, S., Kopacka, I., Pinior, B., & Köfer, J. (2016). The effect of bovine viral diarrhoea virus on fertility in dairy cows: two case-control studies in the province of Styria, Austria. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *129*(3-4), 103–110.

Burgu, I., Alkan, F., Karaoglu, T., Bilge-Dagalp, S., Can-Sahna, K., Güngör, B., & Demir, B.

(2005). Control and eradication programme of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, *112*(7), 271–274.

Burny, A. (1996). Comparative approach to retroviral vaccines. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *12*(5). https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.389

Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., … Thomas, R. (1988). Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, *17*(3). https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90066-1

Burridge, M. J., Thurmond, M. C., Miller, J. M., Schmerr, M. J., & Van Der Maaten, M. J. (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Canadian Journal of Comparative Medicine* , *46*(3), 270-271.

Buxton, B. A., Hinkle, N. C., & Schultz, R. D. (1985). Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(1), 123–126.

Byrne, A. W., Guelbenzu-Gonzalo, M., Strain, S. A. J., McBride, S., Graham, J., Lahuerta-Marin, A., … McDowell, S. (2017). Assessment of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and Mycobacterium bovis: A herd-level risk factor analysis from Northern Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, *141*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.007

Callens, N., Brügger, B., Bonnafous, P., Drobecq, H., Gerl, M. J., Krey, T., … Rouillé, Y. (2016). Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathogens*, *12*(3), e1005476. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005476

Camargos, M. F., Pereda, A., Stancek, D., Rocha, M. A., Reis, J. K. P. dos, Greiser-Wilke, I., & Leite, R. C. (2007). Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. *Virus Genes*, *34*(3), 343–350. https://doi.org/10.1007/s11262-006-0011-x

Campos, M., Ohmann, H. B., Hutchings, D., Rapin, N., Babiuk, L. A., & Lawman, M. J.

(1989). Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. *Cellular Immunology*, *120*(1). https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90193-7

Camargos, M. F., Reis, J. K. P., & Leite, R. C. (2004). Bovine Leukemia Virus. V*irus Reviews & Research: Journal of the Brazilian Society for Virology, 9*(1). https://doi.org/10.17525/vrrjournal.v9i1.221

Carvalho A., Almeida J.C., Guimarães L., Estanislao P., Freitas J.C., & Santos C. (1998). Anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina em animais da raça leiteira importados do Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Gaúcha*, *4*, 35-38.

Chamizo Pestana, E. G. (2005). Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *6* (7), 1–25.

Chang, L., Qi, Y., Liu, D., Du, Q., Zhao, X., & Tong, D. (2021). Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China. *BMC Veterinary Research*, *17*(1), 66. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02747-7

Chase, C. C. L. (2013). The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, *41*(1), 52–60. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009

Chase, C. C. L., Fulton, R. W., O'Toole, D., Gillette, B., Daly, R. F., Perry, G., & Clement, T. (2017). Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Veterinary Microbiology*, *206*, 69–77. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.016

Choi, K. Y., Liu, R. B., & Buehring, G. C. (2002). Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *Journal of Virological Methods*, *104*(1). https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00040-x

Collen, T., Carr, V., Parsons, K., Charleston, B., & Morrison, W. I. (2002). Analysis of the repertoire of cattle CD4(+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *87*(3-4), 235–238.

https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00088-0

Collen, T., & Morrison, W. I. (2000). CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Research*, *67*(1), 67–80. https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00131-

Commission European. (2004). 2004/558/EC Intra-community trade IBR. *Official Journal of the European Union,* (249), 20–25.

Commission European. (2017). Commission Implementing Decision (EU) 2017/888 of 22 May 2017 amending Decision 2003/467/EC as regards the official tuberculosis-free status of the region of Umbria of Italy and of the enzootic-bovine-leukosis-free status of Poland, amending Decision 2004. *Official Journal of the European Union*, (135), 27–34.

Copeland, T. D., Morgan, M. A., & Oroszlan, S. (1983). Complete amino acid sequence of the nucleic acid-binding protein of bovine leukemia virus. *FEBS Letters*, *156*(1), 37–40. https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80243-9

Corredor-Figueroa, A. P., Salas, S., Olaya-Galán, N. N., Quintero, J. S., Fajardo, Á., Soñora, M., … Gutiérrez, M. F. (2020). Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. *Infection, Genetics and Evolution (Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases)*, *80*, 104171. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104171

Dabak, M., Karapinar, T., Gulacti, I., Bulut, H., Kizil, O., & Aydin, S. (2007). Hemorrhagic syndrome-like disease in calves with bovine viral diarrhea and mucosal disease complex. *Journal of Veterinary Internal Medicine* , *21*(3). https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[514:hsdicw]2.0.co;2

D'Angelino, J. L., Garcia, M., & Birgel, E. H. (1998). Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, *30*(1), 13–15. https://doi.org/10.1023/a:1005053124518

D'Arce, R. C. F., Almeida, R. S., Silva, T. C., Franco, A. C., Spilki, F., Roehe, P. M., & Arns, C. W. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, *88*(4), 315–324. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00126-8

de Brogniez, A., Bouzar, A. B., Jacques, J.-R., Cosse, J.-P., Gillet, N., Callebaut, I., … Willems, L. (2015). Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus. *Journal of Virology*, *89*(17), 8945–8956. https://doi.org/10.1128/jvi.00261-15

De Brun, M. L. (2023). *Diagnóstico, inmunidad y vacunación en bovinos: avances en los principales virus que afectan la producción nacional* (Tesis de Doctorado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.

De Brun, L., Algorta, A., Alvarez, J.P., Puentes, R. (2013). Transmisión de la Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 195-196). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

De Brun, M. L., Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., … Puentes, R. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , *34*(3). https://doi.org/10.1177/10406387221085581

Dean, H. J., & Leyh, R. (1999). Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine*, *17*(9-10), 1117–1124. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00329-6

Della Libera, A. M. M. P., de Souza, F. N., Batista, C. F., Santos, B. P., de Azevedo, L. F. F., Sanchez, E. M. R., … Blagitz, M. G. (2015). Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary Research*, *46*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s13567-014-0125-4

Deregt, D., & Loewen, K. G. (1995). Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *The Canadian Veterinary Journal.* , *36*(6), 371–378.

Desforges, J.-P. W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S., & Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86, 126–139. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.007

Dias, R. K., Cargnelutti, J. F., Weber, M. N., Canal, C. W., Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., …

Flores, E. F. (2017). Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, *203*, 221-228. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.021

d'Offay, J. M., Eberle, R., Fulton, R. W., & Kirkland, P. D. (2016). Complete genomic sequence and comparative analysis of four genital and respiratory isolates of bovine herpesvirus subtype 1.2b (BoHV-1.2b), including the prototype virus strain K22. *Archives of Virology*, *161*(11), 3269-3274. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3026-1

Donis, R. O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *11*(3), 393–423. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30459-x

Dubovi, E. J. (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals (Journal of the International Association of Biological Standardization)*, *41*(1), 8–13. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004

Edwards, S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, *9*(1), 115-130. https://doi.org/10.20506/rst.9.1.486

Edwards, S., Newman, R. H., & White, H. (1991). The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *The British Veterinary Journal*, *147*(3). https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90046-P

Edwards, S., White, H., & Nixon, P. (1990a). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. *Veterinary Microbiology*, *22*(2-3), 213–223. https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90108-8

EFSA Panel on Animal Health and Welfare. (2015). Enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal,13*(7), 4188. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4188

EFSA Panel on Animal Health and Welfare, More, S., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., … Bicout, D. (2017). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL). *EFSA Journal, 15*(8), e04956. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4956

Endoh, D., Mizutani, T., Kirisawa, R., Maki, Y., Saito, H., Kon, Y., … Hayashi, M. (2005). Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Research*, *33*(6), e65. https://doi.org/10.1093/nar/gni064

Engels, M., Steck, F., & Wyler, R. (1981). Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*, *67*(2), 169-174. https://doi.org/10.1007/BF01318601

Engels, M., & Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, *53*(1-2). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01230-8

Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., Render, C. L., Febvay, C., & Houseman, J. T. (2012). Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *95*(2). https://doi.org/10.3168/jds.2011-4760

Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Sabo, K. M., & Sordillo, L. M. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International*, *2011*, 1–5. https://doi.org/10.4061/2011/915747

Fenton, A., Nettleton, P. F., Entrican, G., Herring, J. A., Malloy, C., Greig, A., & Low, J. C. (1991). Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. *Archives of Virology*, *3*,(Supl.), 169-174 https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9153-8_20

Ferrer, J. F., Marshak, R. R., Abt, D. A., & Kenyon, S. J. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Annales de Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research, 9*(4), 851–857

Ferrer, J. F., Kenyon, S. J., & Gupta, P. (1981). Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science*, *213*(4511), 1014–1016. https://doi.org/10.1126/science.6267692

Flores, E. (2018). Diarrea vital bovina: una enfermedad con múltiples presentaciones clínicas. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas Buiatría* (Vol. XLVI, pp. 14-21). Paysandú: CMVP.

Flores E.F., Weiblen R., Oliveira C., & Kreutz L.C. (1992) Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soros de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *A Hora Veterinária*, *12*, 5-8.

Foil, L. D., Seger, C. L., French, D. D., Issel, C. J., McManus, J. M., Ohrberg, C. L., & Ramsey, R. T. (1988). Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, *25*(5), 374–376. https://doi.org/10.1093/jmedent/25.5.374

Fray, Paton, D. J., & Alenius, S. (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science*, *60-61*, 615-627. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00082-8

Fredriksen, B., Sandvik, T., Løken, T., & Odegaard, S. A. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *The Veterinary Record*, *144*(5), 111-114. https://doi.org/10.1136/vr.144.5.111

Frie, M. C., Sporer, K. R., Wallace, J. C., Maes, R. K., Sordillo, L. M., Bartlett, P. C., & Coussens, P. M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *182*, 125–135. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013

Frie, M. C., Sporer, K. R. B., Benitez, O. J., Wallace, J. C., Droscha, C. J., Bartlett, P. C., & Coussens, P. M. (2017). Dairy cows naturally infected with bovine leukemia virus exhibit abnormal b- and t-cell phenotypes after primary and secondary exposures to keyhole limpet hemocyanin. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*, 112. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00112

Frie, M. C., & Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *163*(3-4),

103–114. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014

Fukuyama, S., Kodama, K., Hirahara, T., Nakajima, N., Takamura, K., Sasaki, O., & Imanishi, J. (1993). Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science* , *55*(1), 99-106. https://doi.org/10.1292/jvms.55.99

Fulton, R. W., Cook, B. J., Payton, M. E., Burge, L. J., & Step, D. L. (2020). Immune response to bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*, *38*(24), 4032–4037. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.058

Fulton, R. W., Johnson, B. J., Briggs, R. E., Ridpath, J. F., Saliki, J. T., Confer, A. W., … Payton, M. E. (2006). Challenge with Bovine viral diarrhea virus by exposure to persistently infected calves: protection by vaccination and negative results of antigen testing in nonvaccinated acutely infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* , *70*(2), 121–127.

Furtado A. (2016). *Detección de herpes virus bovino tipo 1 y 5 en ganglios trigéminos en el Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.

Furtado, A., Rosadilla, D., Franco, G., Piaggio, J., & Puentes, R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo), 49*(191), 29–37. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/241

Fux, R., & Wolf, G. (2012). Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: a pitfall for BVDV-eradication programs? *Veterinary Microbiology*, *161*(1-2), 13-19 https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.001

Garcia-Etxebarria, K., Sistiaga-Poveda, M., & Jugo, B. M. (2014). Endogenous retroviruses in domestic animals. *Current Genomics*, *15*(4), 256–265. https://doi.org/10.2174/1389202915666140520003503

Gatot, J.-S., Callebaut, I., Van Lint, C., Demonté, D., Kerkhofs, P., Portetelle, D., …

Kettmann, R. (2002). Bovine leukemia virus SU protein interacts with zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *Journal of Virology*, *76*(16), 7956–7967. https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.7956-7967.2002

Gil, A., Sienra, R., Guarino, H., Piaggio, J., Arrillaga, C. (2000). Sistema de monitoreo en Salud Animal: Primera experiencia en ganado lechero en el Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Congreso Mundial de Buiatria* (Vol. XXI, p. 122) Paysandú: CMVP.

Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., … Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, *4*(1), 1–32. https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18

Gillet, N. A., Hamaidia, M., de Brogniez, A., Gutiérrez, G., Renotte, N., Reichert, M., … Willems, L. (2016a). Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. *PLoS Pathogens*, *12*(4), e1005588. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005588

Gillet, N. A., & Willems, L. (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*, *13*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3

Giovanna, M., Carlos, U. J., María, U. A., & Gutierrez, M. F. (2013). Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open Journal of Medical Microbiology*, *3*(1), 84–90. https://doi.org/10.4236/ojmm.2013.31013

Givens, Heath, A. M., Brock, K. V., Brodersen, B. W., Carson, R. L., & Stringfellow, D. A. (2003). Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *American Journal of Veterinary Research*, *64*(4), 428-434 https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.428

Glew, E. J., Carr, B. V., Brackenbury, L. S., Hope, J. C., Charleston, B., & Howard, C. J. (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic

cells. *The Journal of General Virology*, *84*(Pt 7), 1771-1780. https://doi.org/10.1099/vir.0.18964-0

Gonda, M. G., Fang, X., Perry, G. A., & Maltecca, C. (2012). Measuring bovine viral diarrhea virus vaccine response: using a commercially available ELISA as a surrogate for serum neutralization assays. *Vaccine*, *30*(46), 6559–6563. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.047

Gottschalk, E. E., Greiser-Wilke, I., Frey, H. R., Liess, B., & Moennig, V. (1992). An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus--a comparison with BVD virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B=Journal of Veterinary Medicine. Series B*, *39*(6), 467–472. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01195.x

Grau M. A., y Monti G. (2010) Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria, 42*(2): 87–91. https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000200010

Griebel, P. J. (2015). BVDV vaccination in North America: risks versus benefits. *Animal Health Research Reviews* , *16*(1), 27-32. https://doi.org/10.1017/S1466252315000080

Griebel, P. J., Ohmann, H. B., Lawman, M. J., & Babiuk, L. A. (1990). The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T lymphocytes. *The Journal of General Virology*, *71 (2)*, 369–377. https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-369

Griebel, P. J., Qualtiere, L., Davis, W. C., Gee, A., Bielefeldt Ohmann, H., Lawman, M. J., & Babiuk, L. A. (1987). T lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus type-1 infection. *Viral Immunology*, *1*(4), 287–304. https://doi.org/10.1089/vim.1987.1.287

Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *20*(1), 5–19. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006

Guarino, H., Maisonnave, J., Capano, F., & Pereira, J. (1981). Primer aislamiento e

identificación del virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina en el Uruguay. *Veterinaria*, *17*(78), 131–134. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/1023

Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M. V., Gil, A., & Dargatz, D. A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, *85*(1-2), 34–40. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.012

Gutiérrez, G., Alvarez, I., Merlini, R., Rondelli, F., & Trono, K. (2014b). Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*, *10*(1), 1–5. https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-82

Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Dus Santos, M. J., Rondelli, F., … Trono, K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, *151*(3-4), 255–263.

Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., de Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., … Willems, L. (2014a). Vaccination against δ-retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*, *6*(6), 2416-2427. https://doi.org/10.3390/v6062416

Gutiérrez, S. E., Esteban, E. N., Lützelschwab, C. M., & Juliarena, M. A. (2017). Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection. En M. Abubakar (Ed.), *Trends and Advances in Veterinary Genetics* (pp. 101-126). Rijeka: InTech. https://doi.org/10.5772/65804

Gutiérrez, S. E., Lützelschwab, C. M., Barrios, C. N., & Juliarena, M. A. (2020). Leucosis bovina. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru* , *31*(3), e16913. https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16913

Guy, J. S., & Potgieter, L. N. (1985). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(4), 893–898.

Hafez, S. M., Sharif, M., Al-Sukayran, A., & Dela-Cruz, D. (1990). Preliminary studies on enzootic bovine leukosis in Saudi dairy farms. *PubMed, 97(*2), 61-63.

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2155767

Hajj, H. E., Nasr, R., Kfoury, Y., Dassouki, Z., Nasser, R., Kchour, G., & Bazarbachi, A. (2012). Animal models on HTLV-1 and related viruses: what did we learn? *Frontiers in Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00333

Hayashi, T., Mekata, H., Sekiguchi, S., Kirino, Y., Mitoma, S., Honkawa, … Norimine, J. (2017). Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads. *The Journal of Veterinary Medical Science* , *79*(9), 1552–1555. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0601

Heinecke, N., Tórtora, J., Martínez, H. A., González-Fernández, V. D., & Ramírez, H. (2017). Detection and genotyping of bovine leukemia virus in Mexican cattle. *Archives of Virology*, *162*(10), 3191–3196. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3477-z

Hemmatzadeh, F., & Amini, F. (2009). Dot-blot enzyme immunoassay for the detection of bovine viral diarrhea virus antibodies. *Veterinarski Arhiv*, *79*(4), 343–350.

Heriazon, A., Hamilton, K., Huffman, J., Wilkie, B. N., Sears, W., Quinton, M., & Mallard, B. A. (2011). Immunoglobulin isotypes of lactating Holstein cows classified as high, average, and low type-1 or -2 immune responders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *144*(3-4), 259–269.

Hopkins, S. G., & DiGiacomo, R. F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *13*(1), 107–128. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30367-4

Horner, G. W., Tham, K. M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S., & Houghton, T. (1995). Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription--polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Veterinary Microbiology*, *43*(1), 75–84. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00080-g

Houe, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *11*(3), 521-547. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30465-5

Houe, H., Lindberg, A., & Moennig, V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , *18*(5), 427-436. https://doi.org/10.1177/104063870601800501

Hutchinson, H. C., Ruggiero, V. J., Norby, B., Sporer, K. R. B., & Bartlett, P. C. (2021). Diagnostic Measures of Disease Progression in Cattle Following Natural Infection with Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*, *10*(8), 987. https://doi.org/10.3390/pathogens10080987

Inabe, K., Ikuta, K., & Aida, Y. (1998). Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology*, *245*(1), 53-64. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9140

International Committee on Bovine Leukosis. (1968). Criteria for the Determination of the Normal and Leukotic State in Cattle. *Journal of the National Cancer Institute, 41*(1), 243–263. https://doi.org/10.1093/jnci/41.1.243

Jensen, J., & Schultz, R. D. (1990). Bovine natural cell mediated cytotoxicity (NCMC): activation by cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *24*(2), 113–124. https://doi.org/10.1016/0165-2427(90)90014-j

Jimba, M., Takeshima, S. N., Murakami, H., Kohara, J., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., … Aida, Y. (2012). BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Veterinary Research*, *8*. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-167

Johannisson, A., & Festin, R. (1995). Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45R0 is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry*, 19(4), 343–352. https://doi.org/10.1002/cyto.990190409

Jones, C. (2009). Regulation of Innate Immune Responses by Bovine Herpesvirus 1 and Infected Cell Protein 0 (bICP0). *Viruses*, *1*(2), 255–275. https://doi.org/10.3390/v1020255

Jones, C. (2019). Bovine Herpesvirus 1 Counteracts Immune Responses and Immune-Surveillance to Enhance Pathogenesis and Virus Transmission. *Frontiers in Immunology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01008

Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Ceriani, M. C., & Esteban, E. N. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *Journal of Dairy Science*, *99*(6), 4586-4589. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10480

Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Lützelschwab, C. M., Esteban, E. N., & Gutiérrez, S. E. (2017). Bovine leukemia virus: current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment, Volume 9*, 13–26. https://doi.org/10.2147/vaat.s113947

Juliarena, M. A., Gutierrez, S. E., & Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *American Journal of Veterinary Research, 68*(11). https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1220

Kaashoek, M. J., Straver, P. H., Van Rooij, E. M., Quak, J., & Van Oirschot, J. T. (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *The Veterinary Record*, *139*(17), 416-421. https://doi.org/10.1136/vr.139.17.416

Kabeya, H., Ohashi, K., Ohishi, K., Sugimoto, C., Amanuma, H., & Onuma, M. (1996). An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, *14*(12), 1118-1122. https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00047-3

Kabeya H., Ohashi K., Onuma M. (2001) Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Veterinary Medical Science, 63*(7), 703-708. https://doi.org/10.1292/jvms.63.703

Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Yasuhiro, O. U. E., Edamatsu, H., Konno, Y., … Murakami, K. (2014). Effect of Freezing Treatment on Colostrum to Prevent the Transmission of Bovine Leukemia Virus. *The Journal of Veterinary Medical Science, 76*(2), 255–257. https://doi.org/10.1292/jvms.13-0253

Katoh, I., Kyushiki, H., Sakamoto, Y., Ikawa, Y., & Yoshinaka, Y. (1991). Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment. *Journal of Virology*,

65(12), 6845–6855. https://doi.org/10.1128/jvi.65.12.6845-6855.1991

Katoh, I., Yasunaga, T., & Yoshinaka, Y. (1993). Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. *Journal of Virology*, *67*(4), 1830–1839. https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1830-1839.1993

Kettmann, R., Deschamps, J., Cleuter, Y., Couez, D., Burny, A., & Marbaix, G. (1982). Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(8). https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2465

Kettmann, R., Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Cuny, G., Ghysdael, J., Mammerickx, … Bernardi, G. (1979). Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(10), 4822–4826. https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.4822

Kettmann, R., Portetelle, D., Mammerickx, M., Cleuter, Y., Dekegel, D., Galoux, M., … Chantrenne, H. (1976). Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(4), 1014–1018. https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1014

Khodakaram-Tafti, A., & Ikede, B. O. (2005). A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *The Canadian Veterinary Journal.* , *46*(7), 635–637.

Kim, S. G., & Dubovi, E. J. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, *31*(2), 103–106. https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00023-x

Klintevall, K., Ballagi-Pordány, A., Näslund, K., & Belák, S. (1994). Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally

infected calves. *Veterinary Microbiology, 42*(2-3), 191–204. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90018-3

Kobayashi, T., Inagaki, Y., Ohnuki, N., Sato, R., Murakami, S., & Imakawa, K. (2019). Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. *Preventive Veterinary Medicine, 178,* 104680.https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.009

Kohara, J., Takeuchi, M., Hirano, Y., Sakurai, Y., & Takahashi, T. (2018). Vector control efficacy of fly nets on preventing bovine leukemia virus transmission. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *80*(10), 1524–1527. https://doi.org/10.1292/jvms.18-0199

Konishi, M., Ishizaki, H., Kameyama, K.-I., Murakami, K., & Yamamoto, T. (2018). The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1724-5

Kramps, J. A., Quak, S., Weerdmeester, K., & van Oirschot, J. T. (1993). Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Veterinary Microbiology*, *35*(1-2), 11-21.https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90112-k

Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Kelton, D. F., Hutchins, W. A., & van der Meer, F. J. U. M. (2018). Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies. *Journal of Dairy Science*, *101*(3), 2433–2437. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13626

Kupferschmied, H. U., Kihm, U., Bachmann, P., Müller, K. H., & Ackermann, M. (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*, *25*(3), 439-443. https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90052-x

LaDronka, R. M., Ainsworth, S., Wilkins, M. J., Norby, B., Byrem, T. M., & Bartlett, P. C. (2018). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. *Veterinary Medicine International*, *2018*, 1-8. https://doi.org/10.1155/2018/5831278

Lairmore, M. D. (2014). Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic

virus type-1: insights in transmission and pathogenesis. *Annual Review of Animal Biosciences*, *2*, 189–208. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114117

Lambot, M., Douart, A., Joris, E., Letesson, J. J., & Pastoret, P. P. (1997). Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *The Journal of General Virology*, *78 (5)*, 1041–1047. https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1041

Lanyon, S. R., Anderson, M. L., Bergman, E., & Reichel, M. P. (2013). Validation and evaluation of a commercially available ELISA for the detection of antibodies specific to bovine viral diarrhoea virus (bovine pestivirus). *Australian Veterinary Journal*, *91*(1-2), 52–56. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.01010.x

Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal* , *199*(2), 201-209.https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024

Larson, R. L., Brodersen, B. W., Grotelueschen, D. M., Hunsaker, B. D., Burdett, W., Brock, K. V., … Dargatz, D. A. (2005). Considerations for bovine viral diarrhea (BVD) testing. *The Bovine Practitioner*, 39(2), 96–100. https://doi.org/10.21423/bovine-vol39no2p96-100

Lawman, M. J., Gifford, G., Gyongyossy-Issa, M., Dragan, R., Heise, J., & Babiuk, L. A. (1987). Activity of polymorphonuclear (PMN) leukocytes during bovine herpes virus-1 induced respiratory disease: effect of recombinant bovine interferon alpha I1. *Antiviral Research*, *8*(5-6), 225–237. https://doi.org/10.1016/s0166-3542(87)80001-3

Lawson, J. S., Salmons, B., & Glenn, W. K. (2018). Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). *Frontiers in Oncology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00001

Lee, J., Kim, Y., Kang, C. S., Cho, D. H., Shin, D. H., Yum, Y. N., … Han, K. (2005). Investigation of the Bovine Leukemia Virus Proviral DNA in Human Leukemias and Lung cancers in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, *20*(4), 603–606.

https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.603

Leites, M, & Puentes, R. (2017a). Estandarización de una técnica de ELISA indirecto para la detección de isotipos IgG1 e 2 contra Rinotraqueítis infecciosa bovina. En *Jornadas Técnicas Veterinarias* (Vol. 10, pp. 32-33). Montevideo: Facultad de Veterinaria, Udelar.

Leites, M. &, Puentes, R. (2017b). Quantification of immunoglobulin isotypes against Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in vaccinated and naturally infected animals. En Sociedad Argentina de Virología (Ed.), *Proceedings of the XII Congreso Argentino de Virologia* (pp. 26-28). Buenos Aires: Sociedad Argentina de Virología.

Leisering, A. (1871). Hypertrophy der Malpigischen Korperchen der Milz. *Bericht uber das Veterinarwesen im Konigreich Sachsen, 16*,15–16.

Lemaire, M., Meyer, G., Baranowski, E., Schynts, F., Wellemans, G., Kerkhofs, P., & Thiry, E. (2000a). Production of Bovine Herpesvirus Type 1-Seronegative Latent Carriers by Administration of a Live-Attenuated Vaccine in Passively Immunized Calves. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(11), 4233-4238. https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4233-4238.2000

Lemaire, M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, J. J., & Thiry, E. (2000b). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(5), 1885-1894.https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1885-1894.2000

Letellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G., & Vanopdenbosch, E. (1999). Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5’ untranslated region. *Veterinary Microbiology*, *64*(2-3), 155-167.https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00267-3

Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., González, E. T., & Sentsui, H. (2003). Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Veterinary Microbiology*, *96*(1), 17–23. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00202-5

Lindberg, A. L. (2003). Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *The*

Veterinary Quarterly, *25*(1), 1-16. https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695140

Lindberg, A., & Houe, H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(1-2), 55-73.https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.07.018

Llames, L., Goyache, J., Domenech, A., Montaña, A. V., Suarez, G., & Gomez-Lucia, E. (2001). Cellular distribution of bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72(env), and Pr66(gag-pro) in persistently infected cells. *Virus Research*, *79*(1-2), 47–57. https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00291-x

Lojkić, I., Balić, D., Rudan, N., Kovačić, M., Čač, Ž., Periškić, M., … Grozdanić, I. C. (2013). Eradication of bovine leukosis virus on a diary farm through improved virus detection. *Veterinarski Arhiv*, 83, 581–591.

Luzzago, C., Bandi, C., Bronzo, V., Ruffo, G., & Zecconi, A. (2001). Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Veterinary Microbiology*, *83*(3), 265-274. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00429-1

Ma, B., Gong, Q., Sheng, C., Liu, Y., Ge, G., Li, D., … Du, R. (2021). Prevalence of bovine leukemia in 1983–2019 in China: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, *150*, 104681. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104681

Ma, J.-G., Zheng, W.-B., Zhou, D.-H., Qin, S.-Y., Yin, M.-Y., Zhu, X.-Q., & Hu, G.-X. (2016). First Report of Bovine Leukemia Virus Infection in Yaks (Bos mutus) in China. *BioMed Research International, 2016*, 1-4. https://doi.org/10.1155/2016/9170167

Maezawa, M., Watanabe, K.-I., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., & Inokuma, H. (2018). A clinical case of enzootic bovine leukosis in a 13-month-old Holstein heifer. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, *66*(3), 209–213. https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/71343/6/p209-213%20Hisashi_Inokuma.pdf

Mamoun, R. Z., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., … Guillemain, B. (1990). Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *Journal of Virology*,

64(9), 4180–4188. https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4180-4188.1990

Manaa, E. A., Marawan, M. A., Abdelhady, A., & Selim, A. (2020). Association between bovine leukemia virus infection, reproductive performance and milk production in water buffaloes and dairy cattle in Egypt. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *8*(11), 1109-1113. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.11.1109.1113

Marschik, T., Obritzhauser, W., Wagner, P., Richter, V., Mayerhofer, M., Egger-Danner, C., … Pinior, B. (2018). A cost-benefit analysis and the potential trade effects of the bovine viral diarrhoea eradication programme in Styria, Austria. *Veterinary Journal*, *231*, 19-29. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.010

Mars, M. H., Bruschke, C. J., & van Oirschot, J. T. (1999). Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Veterinary Microbiology*, *66*(3), 197-207. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00009-7

Mars, M. H., de Jong, M. C., van Maanen, C., Hage, J. J., & van Oirschot, J. T. (2000). Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Veterinary Microbiology*, *76*(1). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00218-2

Marshall, R. L., Israel, B. A., & Letchworth, G. J. (1988). Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, *165*(2), 338-347. https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90578-8

Maya, L., Puentes, R., Reolón, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., … Colina, R. (2016). Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in uruguay. *Archives of Virology*, *161*(3). https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4

Mechor, G. D., Rousseaux, C. G., Radostits, O. M., Babiuk, L. A., & Petrie, L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. , *51*(4), 452–459.Mederos, A., & Irigoyen, D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XXVI, pp. 19-20) Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Mehta, B. A., & Maino, V. C. (1997). Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 208(1), 49–59. https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00127-0

Mekata, H., Sekiguchi, S., Konnai, S., Kirino, Y., Horii, Y., & Norimine, J. (2015). Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* , *77*(9), 1115–1120. https://doi.org/10.1292/jvms.14-0624

Mekata, H., Yamamoto, M., Hayashi, T., Kirino, Y., Sekiguchi, S., Konnai, S., … Norimine, J. (2018). Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, *66*(3), 157–163.

Merlini, R., Gutiérrez, G., Alvarez, I., Jaworski, J. P., Carignano, H., Poli, M., … Trono, K. (2016). Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Archives of Virology*, *161*(11), 3215–3217. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2973-x

Metzler, A. E., Matile, H., Gassmann, U., Engels, M., & Wyler, R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, *85*(1-2), 57–69. https://doi.org/10.1007/bf01317006

Meyers, G., Ege, A., Fetzer, C., von Freyburg, M., Elbers, K., Carr, V., … Schürmann, E.-M. (2007). Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *Journal of Virology*, *81*(7), 3327–3338. https://doi.org/10.1128/JVI.02372-06

Meyers, G., & Thiel, H. J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research*, *47*, 53–118. https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60734-4

Miller, J. M., & Van Der Maaten, M. J. (1978). Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Annales de Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research*, *9*(4), 871–877.

Miller, J. M., & van der Maaten, M. J. (1984). Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, *45*(4), 790–794.

Miller, J. M., & Van der Maaten, M. J. (1986). Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *American Journal of Veterinary Research*, *47*(2), 223–228.

Miller, J. M., Whetstone, C. A., & Van der Maaten, M. J. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *American Journal of Veterinary Research*, *52*(3), 458–461. https://doi.org/10.2460/ajvr.1991.52.03.458

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2014). *Anuario*. Recuperado de http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014,O,es,0

Mionetto, M., & Rodríguez, A. (2017). *Asociación entre Leucosis bovina enzoótica y la respuesta inmune humoral natural contra enfermedades infecciosas de interés reproductivo* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.

Mirsky, M. L., Olmstead, C. A., Da, Y., & Lewin, H. A. (1996). The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of Virology*, *70*(4), 2178–2183. https://doi.org/10.1128/jvi.70.4.2178-2183.1996

Mishra, N., & Kalaiyarasu, S. (2019). Bovine Viral Diarrhea Virus. En Y. Singh Malik, R. Kumar Singh & M. Pal Yadav (Eds), *Recent Advances in Animal Virology* (pp. 253–288). Singapore: Springer.

Moennig, V., Houe, H., & Lindberg, A. (2005). BVD control in Europe: current status and perspectives. *Animal Health Research Reviews* , *6*(1). https://doi.org/10.1079/ahr2005102

Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*, *7*(1). https://doi.org/10.3390/pathogens7010029

Moerman, A., Straver, P. J., de Jong, M. C., Quak, J., Baanvinger, T., & van Oirschot, J. T.

(1993). A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *The Veterinary Record*, *132*(25), 622–626. https://doi.org/10.1136/vr.132.25.622

Molina, V., Ruiz-Villamor, E., Sánchez-Cordón, P. J., Risalde, M. A., Pedrera, M., & Gómez-Villamandos, J. C. (2008). Respuesta inmunitaria en la diarrea vírica bovina. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 21*, 85-104. Recuperado de http://hdl.handle.net/10396/4027

Molloy, J. B., Dimmock, C. K., Eaves, F. W., Bruyeres, A. G., Cowley, J. A., & Ward, W. H. (1994). Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. *Veterinary microbiology, 39*(3-4), 323–333. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90168-6

Moratorio, G. (2012). *Aspectos genómicos y evolutivos del virus de la leucosis bovina*. (Tesis de doctorado). -. Facultad de Ciencias, Udelar, Montevideo. Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12008/3966

Moratorio, G., Fischer, S., Bianchi, S., Tomé, L., Rama, G., Obal, G., Cristina, J. (2013). A detailed molecular analysis of complete bovine leukemia virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Veterinary Research*, *44*(1). https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-19

Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K.-I., Yamamoto, T., & Tsutsui, T. (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 84–88. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.001

Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., & Tsutsui, T. (2013). Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009–2011. *Journal of Veterinary Medical Science, 75*(8), 1123-1126. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0374

Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., & Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, *38*(2).

https://doi.org/10.1051/vetres:2006059

Nieto Farias, M. V., Souza, F. N., Lendez, P. A., Martínez-Cuesta, L., Santos, K. R., Della … Dolcini, G. L. (2018). Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 206*, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.012

Nandi, S., Kumar, M., Manohar, M., & Chauhan, R. S. (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, *10*(1). https://doi.org/10.1017/S1466252309990028

Nataraj, C., Eidmann, S., Hariharan, M. J., Sur, J. H., Perry, G. A., & Srikumaran, S. (1997). Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules. *Viral Immunology*, *10*(1), 21–34. https://doi.org/10.1089/vim.1997.10.21

Neill, J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, *41*(1), 2–7. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002

Nekouei, O. A. (2015). *Study of Prevalence, Risk Factors, and Lifetime Impacts of Infection with Bovine Leukemia Virus in the Canadian Dairy Industry*. IslandScholar. https://www.islandscholar.ca/islandora/object/ir%3A15751

Nekouei, O., Stryhn, H., VanLeeuwen, J., Kelton, D., Hanna, P., & Keefe, G. (2015). Predicting within-herd prevalence of infection with bovine leukemia virus using bulk-tank milk antibody levels. *Preventive Veterinary Medicine*, *122*(1-2), 53–60. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.009

Nekouei, O., VanLeeuwen, J., Stryhn, H., Kelton, D., & Keefe, G. (2016). Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *133*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.011

Nelson, D. D., Duprau, J. L., Wolff, P. L., & Evermann, J. F. (2016). Persistent bovine viral diarrhea virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the Mountain Goat (Oreamnos americanus). *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1415.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01415

Nettleton, P. F., & Entrican, G. (1995). Ruminant pestiviruses. *The British Veterinary Journal*, *151*(6). https://doi.org/10.1016/s0007-1935(95)80145-6

Nettleton, P., & Russell, G. (2017). Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In Practice*, *39*(6), 255–272. https://doi.org/10.1136/inp.j2226

Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017a). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, *206*, 78–83. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003

Newcomer, B. W., Cofield, L. G., Walz, P. H., & Givens. (2017b). Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, *138*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.005

Newcomer, B. W., Walz, P. H., Givens, M. D., & Wilson, A. E. (2015). Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis. *Theriogenology*, *83*(3), 360–365.e1. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.028

Nguyen, V. K., & Maes, R. F. (1993). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(4), 979-981. https://doi.org/10.1128/jcm.31.4.979-981.1993

Nishiike, M., Haoka, M., Takashi, D. O. I., Kohda, T., & Mukamoto, M. (2016). Development of a preliminary diagnostic measure for bovine leukosis in dairy cows using peripheral white blood cell and lymphocyte counts. *The Journal of Veterinary Medical Science (The Japanese Society of Veterinary Science)*, *78*(7), 1145–1151. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0022

Nishimori, A., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nakahara, A., Murata, S., & Ohashi, K. (2016). Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science (The Japanese Society of Veterinary Science)*, *78*(5), 791–796. https://doi.org/10.1292/jvms.15-0577

Norby, B., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., & Erskine, R. J. (2016). Effect of infection with bovine

leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *99*(3), 2043–2052. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10089

Notsu, K., Wiratsudakul, A., Mitoma, S., Daous, H. E., Kaneko, C., El-Khaiat, H. M., … Sekiguchi, S. (2020). Quantitative risk assessment for the introduction of bovine leukemia virus-infected cattle using a cattle movement network analysis. *Pathogens*, *9*(11), 903. https://doi.org/10.3390/pathogens9110903

Odeón, A. C., Leunda, M. R., Faverín, C., Boynak, N., Vena, M. M., & Zabal, O. (2009). In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Revista Argentina de Microbiologia*, *41*(2). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19623896/

Odeón, A. C., Risatti, G., Kaiser, G. G., Leunda, M. R., Odriozola, E., Campero, C. M., & Donis, R. O. (2003). Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*, *96*(2). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00210-4

Oğuzoğlu, T. Ç., Koç, B. T., Coşkun, N., Doğan, F., & Duran-Yelken, S. (2019). Endless variety for bovine virus diarrhea viruses: new members of a novel subgroup into Pestivirus A from Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, *51*(5), 1083–1087. https://doi.org/10.1007/s11250-018-01787-w

Ohno, A., Takeshima, S.-N., Matsumoto, Y., & Aida, Y. (2015). Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Research*, *210*, 283–290. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020

Ohshima, K., Morimoto, N., Kagawa, Y., Numakunai, S., Hirano, T., & Kayano, H. (1984). A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. *Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, *46*(4). https://doi.org/10.1292/jvms1939.46.583

Olafson, P., MacCallum, A. D., & Fh, F. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *The Cornell Veterinarian*, *36*, 205–213.

Olaya-Galán, N. N., Corredor-Figueroa, A. P., Guzmán-Garzón, T. C., Ríos-Hernandez, K. S.,

Salas-Cárdenas, S. P., Patarroyo, M. A., & Gutierrez, M. F. (2017). Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiology & Infection*, *145*(15), 3125–3130. https://doi.org/10.1017/s0950268817002

Onuma, M., Hodatsu, T., Yamamoto, S., Higashihara, M., Masu, S., Mikami, T., & Izawa, H. (1984). Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, *45*(6), 1212–1215.

Ooshiro, M., Konnai, S., Katagiri, Y., Afuso, M., Arakaki, N., Tsuha, O., …Ohashi, K. (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *The Veterinary Record*, *173*(21), 527. https://doi.org/10.1136/vr.101833

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2017). Rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa. En *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (12ª ed., pp. 1-20). Recuperado de https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Leucosis bovina enzoótica En *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (12ª ed., pp. 1-12). Recuperado de https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/

Otsuki, H., Takeshima, S.-N., & Aida, Y. (2015). Generation of virus-like particle as a vaccine strategy against bovine leukemia virus. *Retrovirology*, *12*(1), 1–1. https://doi.org/10.1186/1742-4690-12-s1-p47

Ott, S. L., Johnson, R., & Wells, S. J. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, *61*(4), 249–262. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.003

Pacífico, C., Santangelo, F., & Sabatini, D. (2013). Por IBR y DVB, se pierden más de $812 millones al año. En *Seminario de sustentabilidad y modernización de la ganadería*.

Programa de Agronegocios de la UBA, la Universidad de Lomas de Zamora y la Fundación Gestión y Estrategia Agraria (GEA). Buenos Aires.

Pandey, G. S., Simulundu, E., Mwiinga, D., Samui, K. L., Mweene, A. S., …Takada, A. (2017). Clinical and subclinical bovine leukemia virus infection in a dairy cattle herd in Zambia. *Archives of Virology*, *162*(4), 1051–1056. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3205-0

Panei, C. J., Larsen, A. E., Fuentealba, N. A., Metz, G. E., Echeverría, M. G., Galosi, C. M., & Valera, A. R. (2019). Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. *Open Veterinary Journal, 9*(1), 33–37. https://doi.org/10.4314/ovj.v9i1.6

Panei, C. J., Takeshima, S.-N., Omori, T., Nunoya, T., Davis, W. C., Ishizaki, H., Aida, Y. (2013). Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored y lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-Qpcr. *BMC Veterinary Research, 9*(1). https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-95

Park, B. H., Matuschke, B., Lavi, E., & Gaulton, G. N. (1994). A point mutation in the env gene of a murine leukemia virus induces syncytium formation and neurologic disease. *Journal of Virology*. https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7516-7524.1994

Pecora, A., Ms, P. A., Malacari, D. A., Zabal, O., Sala, J. M., Konrad, J. L., Caspe, S. G., … Mj, D. S. (2017). Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), 29* (6). https://doi.org/10.1177/1040638717720246

Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals (Journal of the International Association of Biological Standardization)…*, *31*(2), 107–112. https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00024-1

Petersen, M. I., Alvarez, I., Trono, K. G., & Jaworski, J. P. (2018). Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, *101*(7), 6366–6374. https://doi.org/10.3168/jds.2017-14253

Pinior, B., Firth, C. L., Richter, V., Lebl, K., Trauffler, M., Dzieciol, M., …Käsbohrer, A. (2017). A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Preventive Veterinary Medicine*, *137*(Pt A), 77–92. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014

Platt, R., Coutu, C., Meinert, T., & Roth, J. A. (2008). Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *122*(1-2), 8–15. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.11.009

Polat, M., Ohno, A., Takeshima, S.-N., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y., …Aida, Y. (2014). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Archives of Virology*, *160*(1), 285–296. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2280-3

Polat, M., Takeshima, S.-N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., …Aida, Y. (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, *13*, 4. https://doi.org/10.1186/s12977-016-0239-z

Polat, M., Takeshima, S.-N., & Aida, Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal*, *14*(1), 209. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0876-4

Porta, N. G., Alvarez, I., Suarez Archilla, G., Ruiz, V., Abdala, A., & Trono, K. (2019). Experimental infection of sheep with Bovine leukemia virus (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies. *Revista Argentina de Microbiología*, *51*(4), 316–323. https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.004

Portetelle, D., Bruck, C., Mammerickx, M., & Burny, A. (1980). In animals infected by bovine leukemia virus (BLV) antibodies to envelope glycoprotein gp51 are directed against the carbohydrate moiety. *Virology*, *105*(1). https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90169-5

Portetelle, D., Couez, D., Bruck, C., Kettmann, R., Mammerickx, M., Van der Maaten, M., … Burny, A. (1989). Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology*, *169*(1), 27–33. https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90037-8

Pospísil, Z., Krejcí, J., Jínek, P., Lány, P., Zendulková, D., & Cíhal, P. (1996). Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, *53*(1-2). https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01248-5

Puentes, R. (2016). *Epidemiología, diagnóstico y efecto de la presencia del virus de la leucosis bovina enzoótica en animales asintomáticos sobre parámetros productivos, reproductivos y sanitarios* (Tesis de doctorado). Universidad de la República, Montevideo. Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12008/37571

Puentes, R., Alonzo, P., Benavídez, U., Silva, A. D., Esteves, P. A., Roehe, P. M., & Maisonnave, J. (2007). Primer aislamiento de herpesvirus bovino 1 subtipo 2 (BoHV-1.2) en Uruguay. *Veterinaria*, *42*(168), 9–13. Recuperado a partir de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/317

Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., Álvarez, J. P., Sacco, G., Oliveira, M., & Llambi, S. (2017). Horizontal transmission dynamics of bovine leukemia virus (blv) and negative effect on reproductive performance in naturally infected Holstein heifers. *Science and Animal Health*, *4*(3), 294. https://doi.org/10.15210/sah.v4i3.8295

Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., Da Silva, V., Mansilla, F., Sacco, G., …Capozzo, A. V. (2016a). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Veterinary Research*, 12(1). https://doi.org/10.1186/s12917-016-0749-x

Radostits O., Gay C., Hinchcliff K., & Constable P. (2007). Disease associated with viruses and chlamydia I. En *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses* (pp. 1209–1221). New York: Saunders Elsevier.

Rama G., Meikle A., Puentes R., Moratorio G., Nicolini P., Pessina P., … Pritsch, O. (2010) Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Veterinaria (Montevideo), 46*(177-180), 15–22. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/163

Raue, R., Harmeyer, S. S., & Nanjiani, I. A. (2011). Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Veterinary Journal* , *187*(3). https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.013

Reinhardt, G., L. Carrasco, N. Tadich, & Riedemann, S. (2001). Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para Diarrea Viral Bovina (DVB). En Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (dvb) en 50 predios de la x región, chile: seroneutralización y enzimoinmunoensayo indirecto (elisa-i). *Archivos de Medicina Veterinaria 33*(2). https://doi.org/10.4067/s0301-732x2001000200006.

Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D'Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., …Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria*, *40*(157), 5–28. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/368

Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Käsbohrer, A., & Pinior, B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal* , *220*, 80–87. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005

Ridpath, J. F., Fulton, R. W., Kirkland, P. D., & Neill, J. D. (2010). Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), 22*(2). https://doi.org/10.1177/104063871002200203

Riet Correa, F., Monesiglio, M.C., & Pritsch, O. (2019). Leucosis enzoótica bovina en Uruguay: hacia dónde vamos? En Centro Medico Veterinario Paysandú (Ed.) *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XLVII, pp. 51-53). Paysandú: CMVP.

Ristau, E., Beier, D., & Wittmann, W. (1987). Verlauf der Infektion mit bovinem Leukosevirus (BLV) bei Kälbern nach Applikation von Zellextrakt aus Lymphknotentumoren von

BLV-infizierten Rindern [The course of infection with bovine leukosis virus (BLV) in calves after the administration of cell extract from lymph node tumors of BLV-infected cattle]. *Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin*, *41*(3), 323–331.

Rivero, R., Haedo, F., Féola, R., Capano, F., Guarino, H., Saizar, J., & Bermúdez, M. (1987). Granuloma nasal bovino: Descripción de un caso colectivo y discusión sobre su probable etiología. *Veterinaria*, *24*(98), 5–11. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/860

Rodning, S. P., Marley, M. S. D., Zhang, Y., Eason, A. B., Nunley, C. L., Walz, P. H., … Givens, M. D. (2010). Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology*, *73*(8), 1154–1163. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.017

Rodríguez, S. M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M. T., Boxus, M., …Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*, *3*(7), 1210–1248. https://doi.org/10.3390/v3071210

Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C., & Studdert, M. J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, *123*(3-4), 425–449. https://doi.org/10.1007/BF01317276

Rola-Łuszczak, M., Sakhawat, A., Pluta, A., Ryło, A., Bomba, A., Bibi, N., & Kuźmak, J. (2021). Molecular characterization of the gene of bovine leukemia virus in cattle from pakistan with ngs-based evidence of virus heterogeneity. *Pathogens*, *10*(7), 910. https://doi.org/10.3390/pathogens10070910

Romera, S. A. (2001). *Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus* (Tesis de grado). Universidad de Buenos Aires.

Romero, J. J., Dávila, G., Beita, G., & Dolz, G. (2015). Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, *39*(2), 7–18. https://doi.org/10.15517/rac.v39i2.21767

Ruggiero, V. J. (2019). *Field studies on the control of bovine leukemia virus in dairy cows*. (Tesis de grado). Michigan State University, Ann Arbor.

Ruggiero, V. J., Norby, B., Benitez, O. J., Hutchinson, H., Sporer, K. R. B., Droscha, C., … Bartlett, P. C. (2019). Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *Journal of Dairy Science*, *102*(10). https://doi.org/10.3168/jds.2018-16186

Ruggiero, V. J., & Bartlett, P. C. (2019). Control of bovine leukemia virus in three us dairy herds by culling elisa-positive cows. *Veterinary Medicine International*, *2019*, 3202184. https://doi.org/10.1155/2019/3202184

Ruiz, V., Porta, N. G., Lomónaco, M., Trono, K., & Alvarez, I. (2018). Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267

Rutsaert, S., Bosman, K., Trypsteen, W., Nijhuis, M., & Vandekerckhove, L. (2018). Digital PCR as a tool to measure HIV persistence. *Retrovirology*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12977-018-0399-0

Sadat, S. M. A., Snider, M., Garg, R., Brownlie, R., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2017). Local innate responses and protective immunity after intradermal immunization with bovine viral diarrhea virus E2 protein formulated with a combination adjuvant in cattle. *Vaccine*, *35*(27), 3466–3473. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.029

Sagata, N., Yasunaga, T., Ohishi, K., Tsuzuku-Kawamura, J., Onuma, M., & Ikawa, Y. (1984). Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *The EMBO Journal*, *3*(13), 3231–3237. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02283.x

Saizar, J. (1997). Determinación de la prevalencia de la rinotraqueitis infecciosa bovina - IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, *33*(133), 4–7. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/533

Saizar J, Gil A. (1998). Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en rodeos de carne del Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de*

Buiatría (Vol. XXVI, pp. 10-12). Paysandú: CMVP.

Saliki, J. T., Fulton, R. W., Hull, S. R., & Dubovi, E. J. (1997). Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(4), 803–807. https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.803-807.1997

Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *20*(1). https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005

Sandev, N., Koleva, M., Binev, R., & Ilieva, D. (2004). Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Veterinarski Arhiv*, *74*(6), 411–416.

Santos, G. R., de Oliveira, J. M. B., Brandespim, D. F., da Fonseca Oliveira, A. A., Mota, R. A., & Júnior, J. W. P. (2013). Epidemiological analysis of infection by Enzootic Bovine Leukemia Virus (BLV) in the microregion of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, *35*(4), 371–377. https://doaj.org/article/e3ddebc4a0184e68ab024376748df513

Sayers, R. G. (2017). Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 1340–1352. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11113

Sayers, R. G., Byrne, N., O'Doherty, E., & Arkins, S. (2015). Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. *Research in Veterinary Science*, *100*, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.02.011

Scharnböck, B., Roch, F.-F., Richter, V., Funke, C., Firth, C. L., Obritzhauser, W., … Pinior, B. (2018). A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32831-2

Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M., & Levy, D. (1994). In vivo

leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *Journal of Virology*, *68*(7), 4589-4596. https://doi.org/10.1128/JVI.68.7.4589-4596.1994

Selim, A., Megahed, A. A., Kandeel, S., & Abdelhady, A. (2020). Risk factor analysis of bovine leukemia virus infection in dairy cattle in Egypt. *Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 72*, 101517. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101517

Schwartz, I., & Lévy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary Research*, 25(6), 521–536.

Shaghayegh, A. (2019). Detection and Identification of Enzootic Bovine Leukosis (EBL) in Calves in Iran. *Archives of Razi Institute*, *74*(3), 321–325. https://doi.org/10.22092/ari.2018.120590.1198

Shettigara, P. T., Samagh, B. S., & Lobinowich, E. M. (1989). Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Canadian Journal of Veterinary Research (Revue Canadienne de Recherche Veterinaire)*, *53*(1), 108-110

Silva, L. F. da, Weiblen, R., & Flores, E. F. (2007). Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Ciencia rural* , *37*(5), 1471–1474. https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000500042

Silvera C., & Fraga M. (2019) Virus de la leucosis bovina: un villano silencioso. *Revista INIA 61*, 37-41.

Smirnova, N. P., Bielefeldt-Ohmann, H., Van Campen, H., Austin, K. J., Han, H., Montgomery, D. L., … Hansen, T. R. (2008). Acute non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Research*, *132*(1-2). https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.011

Smith, D. B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E. A., Monath, T., Scott Muerhoff, A., …Becher, P. (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, *98*(8), 2106–2112. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000873

Smith, R. L., Sanderson, M. W., Walz, P. H., & Givens. (2008). Sensitivity of polymerase

chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), 20*(1). https://doi.org/10.1177/104063870802000115

Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C., P… Hanekom, W. A. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *Journal of Immunological Methods*, *362*(1-2), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.007

Sobarzo, G., Martínez, M.A., Vidal, R., Martínez, M.C., & Avendaño, L. (2006). Detección de contaminación por Mollicutes en cultivos celulares mediante amplificación del gen 16S rARN. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *40*(4), 515-520. Recuperado de https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/127981

Solis-Calderon, J. J., Segura-Correa, V. M., Segura-Correa, J. C., & Alvarado-Islas, A. (2003). Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, *57*(4). https://doi.org/10.1016/s0167-5877(02)00230-1

Sordillo L.M., Hicks C.R., & Pighetti M.G. (1994). Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *207*(3), 268–273. https://doi.org/10.3181/00379727-207-43815

Souza, F. N. de, Blagitz, M. G., Latorre, A. O., Ramos Sanchez, E. M., Batista, C. F., Weigel, R. A., … Della Libera, A. M. M. P. (2012). Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science (The Japanese Society of Veterinary Science)*, *74*(2), 221–225.

Souza, F. N., Santos, K. R., Ferronatto, J. A., Ramos Sanchez, E. M., Toledo-Silva, B.,

Heinemann, M. B., De Vliegher, S., & Della Libera, A. M. M. P. (2023). Bovine-associated staphylococci and mammaliicocci trigger T-lymphocyte proliferative response and cytokine production differently. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2772–2783. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22529

Sozzi, E., Righi, C., Boldini, M., Bazzucchi, M., Pezzoni, G., Gradassi, M., …De Mia, G. M. (2020). Cross-reactivity antibody response after vaccination with modified live and killed bovine Viral Diarrhoea Virus (BVD) Vaccines. *Vaccines*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/vaccines8030374

Spilki, F. R., Franco, A. C., & Roehe, P. M. (2012). Analysis of isotype-specific antibody responses to bovine herpesviruses 1.1 and 1.2a allows to estimate the stage of infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(2), 586-593. https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000200021

Ståhl, K., Benito, A., Felmer, R., Zuñiga, J., Reinhardt, G., Rivera, H., …Moreno-López, J. (2009). Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinaria Brasileira = Brazilian Journal of Veterinary Research*, *29*(1), 41–44. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100006

Straub, O. C. (1990). Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. En Z. Dinter & B. Morein (Ed.), *Virus Infections of Ruminants* (pp. 71–108). Amsterdam: Elsevier.

Straub, O. C. (1991). BHV1 infections: Relevance and spread in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *14*(2), 175-186. https://doi.org/10.1016/0147-9571(91)90130-6

Suzuki, A. (2019). *Development and characterisation of recombinant LSDV-vectored dual vaccines against bovine leukaemia virus and lumpy skin disease virus* (Tesis de maestría). Faculty of Health Sciences, Department of Pathology, University of Cape Town. Recuperado de https://hdl.handle.net/11427/31731

Tajima, S., Ikawa, Y., & Aida, Y. (1998). Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *Journal of Virology*, *72*(9).

https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7569-7576.1998

Takeshima, S.-N., Kitamura-Muramatsu, Y., Yuan, Y., Polat, M., Saito, S., & Aida, Y. (2015). BLV-CoCoMo-qPCR-2: improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR assay for bovine leukemia virus by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve. *Archives of Virology*, *160*(5), 1325–1332. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2377-3

Takeshima, S.-N., Watanuki, S., Ishizaki, H., Matoba, K., & Aida, Y. (2016). Development of a direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers. *Archives of Virology*, *161*(6), 1539–1546. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2806-y

Tanaka, A. S., & Komuro, K. (2005). Targeted rearrangement of a chromosomal repeat sequence by transfection of a homologous DNA sequence using purified integrase. *Gene Therapy*, *12*(9), 783–794. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302458

Thiry, E., Saliki, J., Bublot, M., & Pastoret, P. P. (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *10*(1). https://doi.org/10.1016/0147-9571(87)90041-5

Thiry, E., Saliki, J., Schwers, A., & Pastoret, P. P. (1985). Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *The Veterinary Record*, *116*(22). https://doi.org/10.1136/vr.116.22.599

Tikoo, S. K., Campos, M., & Babiuk, L. A. (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research*, *45*. https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60061-5

Tözsér, J. (2010). Comparative studies on retroviral proteases: substrate specificity. *Viruses*, *2*(1), 147–165. https://doi.org/10.3390/v2010147

Trainin, Z., & Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 60, 94–105.

United States Departament of Agriculture. (2007). *Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations*. Recuperado de http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07

_is_BLV.pdf

Uzal, F. A., Plattner, B. L., & Hostetter, J. M. (2016). Alimentary System. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals* (Vol. *2*, 1–257.e2). St. Louis: Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00007-3

Valle, P. S., Skjerve, E., Martin, S. W., Larssen, R. B., Østerås, O., & Nyberg, O. (2005). Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(1-2). https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.07.017

Van Campen, H. (2010). Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Veterinary Microbiology*, *142*(1-2). https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.049

Vanleeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A., & Tremblay, R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *94*(1-2). https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012

van Oirschot, J. T. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *The Veterinary Quarterly*, *17*(1), 29–33. https://doi.org/10.1080/01652176.1995.9694526

van Schaik, G. (2001). Risico en economie van insleep van ziekten op melkveebedrijven. [Risk and economics of disease introduction to dairy farms]. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, *126*(12), 414–418

van Schaik, G., Schukken, Y. H., Nielen, M., Dijkhuizen, A. A., & Benedictus, G. (2001). Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case-control study. *The Veterinary Quarterly*, *23*(2). https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695085

Vonk Noordegraaf, A., Labrovic, A., Frankena, K., Pfeiffer, D. U., & Nielen, M. (2004). Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Preventive Veterinary Medicine*, *62*(1), 51–58. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.09.001

Walker, P. J., Molloy, J. B., & Rodwell, B. J. (1987). A protein immunoblot test for detection of

bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. *Journal of Virological Methods*, *15*(3). https://doi.org/10.1016/0166-0934(87)90098-x

Wallace, P. K., Tario, J. D., Jr, Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S., & Muirhead, K. A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry. Part A (The Journal of the International Society for Analytical Cytology), 73*(11), 1019–1034. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20619

Walz, P. H., Chamorro, M. F., M Falkenberg, S., Passler, T., van der Meer, F., & R Woolums, A. (2020). Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *Journal of Veterinary Internal Medicine (American College of Veterinary Internal Medicine)*, *34*(5), 1690–1706. https://doi.org/10.1111/jvim.15816

Walz, P. H., Givens, M. D., Rodning, S. P., Riddell, K. P., Brodersen, B. W., Scruggs, D., … Grotelueschen, D. (2017). Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live viral vaccine. *Vaccine*, *35*(7), 1046–1054. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.006

Watanuki, S., Takeshima, S.-N., Borjigin, L., Sato, H., Bai, L., Murakami, H., …Aida, Y. (2019). Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Veterinary Research*, *50*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1

Weber, M. N., Silveira, S., Machado, G., Groff, F. H., Mósena, A. C., Budaszewski, R. F., …Canal, C. W. (2014). High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*, *191*. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.035

Wegelt, A., Reimann, I., Granzow, H., & Beer, M. (2011). Characterization and purification of recombinant bovine viral diarrhea virus particles with epitope-tagged envelope proteins. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 6), 1352–1357.

https://doi.org/10.1099/vir.0.029330-0

Wernike, K., Gethmann, J., Schirrmeier, H., Schröder, R., Conraths, F. J., & Beer, M. (2017). Six years (2011–2016) of mandatory nationwide Bovine Viral Diarrhea control in Germany—A success story. *Pathogens*, *6*(4), 50. https://doi.org/10.3390/pathogens6040050

Wernike, K., Michelitsch, A., Aebischer, A., Schaarschmidt, U., Konrath, A., Nieper, H., …Beer, M. (2018). The occurrence of a commercial N and E double mutant BVDV-1 live-vaccine strain in newborn calves. *Viruses*, *10*(5). https://doi.org/10.3390/v10050274

Wernike, K., Schirrmeier, H., Strebelow, H.-G., & Beer, M. (2017). Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany-Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Veterinary Microbiology*, *208*, 25–29. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.009

Whale, A. S., Huggett, J. F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., … Scott, D. J. (2012). Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Research*, *40*(11). https://doi.org/10.1093/nar/gks203

Whetstone, C. A., & Miller, J. M. (1989). Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Archives of Virology*, *107*(1-2). https://doi.org/10.1007/BF01313875

Wilhelmsen, C. L., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Cheville, N. F., & Kluge, J. P. (1991). Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, *52*(2), 269–275.

Willems, L., Kerkhofs, P., Attenelle, L., Burny, A., Portetelle, D., & Kettmann, R. (1997). The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo. *Journal of General Virology, 78*(3), 637–640. https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-3-637

Willems, L., Kerkhofs, P., Dequiedt, F., Portetelle, D., Mammerickx, M., Burny, A., & Kettmann, R. (1994). Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4

open reading frames. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(24), 11532–11536. https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11532

Winkler, M. T. C., Doster, A., & Jones, C. (1999). Bovine herpesvirus 1 can infect CD4+ T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *Journal of Virology*, *73*(10), 8657-8668. https://doi.org/10.1128/jvi.73.10.8657-8668.1999

Yang, Y., Fan, W., Mao, Y., Yang, Z., Lu, G., Zhang, R., … Wang, C. (2016). Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, *99*(5), 3688–3697. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10580

Yates, W. D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Medecine Comparee*, *46*(3), 225–263.

Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, *9*(6). https://doi.org/10.3390/v9060128

Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., …Aida, Y. (2015). Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Research*, *210*, 248–254. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.013

Yurick, D., Khoury, G., Clemens, B., Loh, L., Pham, H., Kedzierska, K., … Purcell, D. (2019). Multiplex droplet digital PCR assay for quantification of human T-cell leukemia virus type 1 subtype c DNA proviral load and t cells from blood and respiratory exudates sampled in a remote setting. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(2). https://doi.org/10.1128/JCM.01063-18

Zaffaroni R., Piaggio J., Núñez A., de Freitas J., Suanes A., Cernicchiaro N., & Gil, A. (2007). Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica en la cuenca lechera sur del Uruguay. En *Jornadas técnicas veterinarias* (Vol. V, pp. 150-151) Montevideo: Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Zaher, K. S., & Ahmed, W. M. (2014). Bovine leukemia virus infection in dairy cows in Egypt. Acad J Cancer Res, 7(2), 126-130.Zhao, X., & Buehring, G. C. (2007). Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology*, *366*(1), 150–165. https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.058

Zirra-Shallangwa, B., González Gordon, L., Hernandez-Castro, L. E., Cook, E. A. J., Bronsvoort, B. M. de C., & Kelly, R. F. (2022). The epidemiology of bovine viral diarrhea virus in low- and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.947515

Zyrianova, I. M., & Kovalchuk, S. N. (2020). Bovine leukemia virus gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis. *Virulence*, *11*(1), 80–87. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1708051