



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS
BOVINA ENZOÓTICA (BLV) EN VAQUILLONAS HOLANDO
INFECTADAS NATURALMENTE E IMPACTO SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE DE LOS ANIMALES**

MARÍA LAUREANA DE BRUN MÉNDEZ

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2018**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS
BOVINA ENZOÓTICA (BLV) EN VAQUILLONAS HOLANDO
INFECTADAS NATURALMENTE E IMPACTO SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE DE LOS ANIMALES**

MARÍA LAUREANA DE BRUN MÉNDEZ

Rodrigo Puentes
Director de Tesis

AÑO
2018



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Ana Meikle; DVM, PhD.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay

Javier Paner; DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la Plata -Argentina

Uruguaysito Benavides; DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

AÑO
2018



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

Análisis longitudinal del virus de la leucosis bovina enzoótica (BLV) en vaquillonas holando infectadas naturalmente e impacto sobre la respuesta inmune de los animales

Por: Dra. María Laureana DE BRUN MÉNDEZ

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Puentes

Tribunal

Presidente: Dra. Ana Meikle

Segundo Miembro: Dr. Carlos Javier Panei

Tercer Miembro: Dr. Uruguaysito Benavides

Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención

Salón de Posgrados
Lunes 5 de noviembre de 2018

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

Montevideo, 5 de Noviembre del 2018

Acta Defensa de Tesis de Maestría Laureana de Brun ANÁLISIS LONGITUDINAL DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA (BLV) EN VAQUILLONAS HOLANDO INFECTADAS NATURALMENTE E IMPACTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE LOS ANIMALES

El objetivo de la tesis de Maestría fue determinar la carga proviral y análisis de la variabilidad genética de bovinos infectados naturalmente con el virus BLV. Además, se determinó la relevancia de la infección del BLV frente a las inmunizaciones a campo contra Clostridium perfringens y el Virus de la Fiebre Aftosa en vaquillonas Holando. El enfoque de la tesis es original y los resultados muy novedosos en un área de gran interés sanitaria, productivo y económico para nuestro país. Es una tesis muy ambiciosa y supera las expectativas de una tesis de Maestría, que incluye diferentes enfoques de la problemática, así como variables de respuesta que sin duda han fortalecido la formación del estudiante.

La presentación del trabajo de tesis realizada por la Dra Laureana de Brun fue clara y utilizando el tiempo previsto. La secuencia de exposición de metodología, resultados y discusión acorde a los objetivos específicos facilitó la comprensión. La Dra de Brun realizó una muy buena interpretación de los resultados con excelente uso de los antecedentes disponibles.

La Dra de Brun demostró gran conocimiento del tema y solvencia a la hora de contestar sobre el trabajo realizado y su impacto en la salud animal. La Dra de Brun presentó apertura a las preguntas y fue crítica con su propio trabajo reflejando madurez científica.

Por lo antedicho, este tribunal de tesis otorga la máxima calificación, aprobándola con mención.



Javier Panei



Uruguaysito Benavidez



Ana Meikle

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Rodrigo Puentes, más allá de todo los conocimientos que me ha brindado, agradezco la confianza depositada en mi y siempre estar estimulándome a crecer tanto académicamente pero más importante aún cómo persona.

Al campo de Recría donde se realizó la parte experimental de esta tesis por su disposición e interés en la investigación.

Al departamento de Ciencias Microbiológicas de Facultad de Veterinaria- UdelaR por permitirme formar parte del equipo.

Al Instituto nacional de tecnología Agropecuaria- INTA- Castelar por recibirme en dos ocasiones de pasantía, abrirme las puertas, enseñarme diferentes técnicas y brindarme su amistad.

A la Escola de Veterinária, Universidad Federal de Minas de Gerais, Brasil por su colaboración.

A mi familia y amigos por el apoyo incondicional.

A cada persona que conocí y me brindó su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Investigación (ANII) por la beca de estudio otorgada y el financiamiento del proyecto FSSA_2014_1_105283, del cual forma parte esta tesis.

Al Programa de Fortalecimiento de la Investigación de Calidad en Salud Animal (PFICSA - CSIC) ex PLANISA por el financiamiento del proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	IV
SUMMARY	VI
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 BLV: AGENTE ETIOLÓGICO	3
2.2 VÍAS DE TRANSMISIÓN	4
2.3 INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA.....	4
2.4 PRESENTACIONES DE LA ENFERMEDAD.....	5
2.5 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL BLV	6
2.6 IMPORTANCIA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA	8
2.7 BLV Y LA RESPUESTA INMUNE.....	10
2.8 FIEBRE AFTOSA Y CLOSTRIDIOSIS: INTERÈS PRODUCTIVO	12
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVOS GENERALES	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Establecimiento de estudio	15
5.2 Aprobación de la Comisión de Bienestar Animal	16
5.3 Estatus serológico a BLV	16
5.4 Materiales y métodos para el objetivo específico número 1:.....	16
5.4.1 <i>Real time</i> PCR (qPCR) con SYBR Green para el gen <i>pol</i> BLV	16
5.4.2 Análisis estadístico	17
5.5 Materiales y Métodos para el objetivo específico número 2:	17
5.5.1 Detección de BLV mediante <i>Nested polymerase chain reaction</i> (nPCR)	17
5.5.2 Secuenciación y análisis filogenético del gen que codifica para la proteína de envoltura gp51 de BLV	18
5.6 Materiales y Métodos para los objetivos específicos números 3 y 4:.....	19
5.6.1 Conformación de los grupos de animales para los ensayos 3 y 4	19
5.6.2 Inmunización contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis	20
5.6.3 Detección de anticuerpos anti toxina alfa, beta y épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> mediante ELISA.....	21
5.6.4 Seroneutralización (SN) <i>in vitro</i> para la cuantificación de anticuerpos anti toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i>	21
5.6.5 Detección de anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) mediante ELISA en fase líquida.....	22
5.6.6 Detección de isotipos contra A24/Cruzeiro mediante ELISA.....	23

5.6.7 Índice de avidéz (AI) de los anticuerpos contra Fiebre Aftosa mediante ELISA.....	23
5.6.8 Análisis estadísticos.....	24
6. RESULTADOS	25
6.1 Anticuerpos totales contra BLV y resultados de los hemogramas	25
6.2 Carga proviral del BLV en vaquillonas Holando	27
6.3 Análisis filogenético	29
6.4 Anticuerpos totales anti-toxinas alfa, beta y épsilon del <i>Clostridium perfringens</i>	31
6.4.1 Respuesta de los animales a la vacunación	31
6.4.2 Respuesta a los diferentes antígenos según estatus a BLV	31
6.5 Anticuerpos neutralizantes <i>anti-toxina</i> épsilon del <i>Clostridium perfringens</i> ..	34
6.6 Comparación de técnicas para la detección de anticuerpos <i>anti-toxina</i> épsilon del <i>Clostridium perfringens</i>	34
6.7 Anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa	34
6.8 Isotipos de anticuerpos específicos contra el virus de la Fiebre Aftosa	36
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES.....	45
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMEN

La Leucosis bovina enzoótica (LBE) es una de las principales virosis que afecta al ganado lechero en Uruguay y en muchos países del mundo desde hace varias décadas. Sin embargo, hasta la fecha aún se discute el real impacto de la infección en animales asintomáticos y su implicancia en la respuesta inmune. El 90% de los animales infectados con el virus de la Leucemia bovina (BLV) son portadores asintomáticos del virus y clínicamente sanos, siendo posible detectar la presencia de anticuerpos circulantes anti-BLV o del ADN proviral en los linfocitos infectados. Debido a la alta prevalencia del BLV en rodeos lecheros del Uruguay, un enfoque basado en la segregación selectiva de animales según la carga proviral en sangre periférica, podría ser una alternativa práctica para el control de la infección. Además es esencial comprender en qué grado y cómo el BLV afecta al sistema inmunológico, en animales portadores asintomáticos. En ese contexto, el objetivo de esta tesis por un lado fue determinar la carga proviral y analizar la variabilidad genética de bovinos infectados naturalmente con BLV y por otro lado evaluar el impacto de la infección del virus frente a las inmunizaciones a campo contra *Clostridium perfringens* y el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) en vaquillonas Holando naturalmente infectadas. Se realizó un seguimiento de un grupo de animales infectados con BLV y otro grupo libre de la infección durante doce meses en un sistema de cría de ganado lechero en confinamiento. La carga proviral se determinó mediante *real time* PCR y la variabilidad genética por secuenciación del ADN y posterior análisis filogenético. Todos los animales fueron inmunizados con tres dosis de una vacuna comercial contra Clostridiosis y una dosis contra el VFA. Se determinó la respuesta inmune humoral mediante diferentes tipos de ELISA contra las toxinas alfa, beta y épsilon del *Cl. perfringens* y seroneutralización *in vitro* para la toxina épsilon. Por otra parte se cuantificaron inmunoglobulinas totales, IgM, IgG1, IgG2 contra el VFA. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el genotipo viral encontrado correspondió al genotipo 1 del BLV y la carga proviral varió significativamente a lo largo del tiempo. Al inmunizar contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis, se encontró una respuesta más baja en los títulos de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa en los bovinos infectados con BLV, pero lo mismo no se observó en los anticuerpos totales para ese virus (VFA) y contra las toxinas del *Cl. perfringens*. Estos resultados confirman el predominio de la circulación del genotipo 1 en esta población bovina con una carga viral fluctuante y demuestran una

respuesta diferencial frente a la vacunación contra Fiebre Aftosa en los animales portadores de BLV.

SUMMARY

Bovine enzootic leukosis is one of the main diseases affecting dairy farm cattle in Uruguay, as many countries for several decades. The real impact of this illness is under dispute up to now in asymptomatic animals and its impact in the immune response. 90% of the infected animals are asymptomatic carriers and clinically healthy, so that it is possible to detect the presence of circulating antibodies or the proviral DNA in infected lymphocytes. Because of the high prevalence of bovine leukosis virus (BLV) in dairy herds in Uruguay, an approach based on animal's selective segregation depending on the proviral load in peripheral blood could be a practical alternative for the control of the disease. Furthermore it is essential to understand how and to what degree the BLV affects the immune system of the asymptomatic carriers. The objective of this thesis was to determine the proviral load and the analysis of the genetical variation in naturally infected cattle, as well as evaluate the impact of the infection in immunizations against *Clostridium perfringens* and Foot and mouth disease virus (FMDV) on naturally infected Holstein heifers. Two groups of cattle were monitored for a 12 month period, one of leukosis infected cattle and one of non infected cattle, all the animals belonged to a dairy cattle rearing system. The proviral load was measured using *real time* PCR, the genetical variability was determined by DNA sequencing and its posterior phylogenic analysis. The animals received three doses of a vaccine against clostridia, which is highly commercialized in the region and a unique dose of the vaccine against FMDV. The humoral immune response was determined using different types of ELISA in order to quantify the total antibodies against alfa, beta and epsilon toxins of the *Cl.perfringens*. Besides an *in-vitro* seroneutralization has been done for the *Cl.perfringens* epsilon toxin. On the other hand the total immunoglobulins against FMDV were determines, as its subclasses (*IgM*, *IgG1*, *IgG2*). Genotype 1 of BLV was the viral genotype found , it was observed that the proviral load showed significant variations along the months. After immunization against foot and mouth disease virus and clostridia, a significative minor response has been found in the titles of *IgM* e *IgG1* against foot and mouth disease in cattle infected with BLV, something that did not happen in the total antibodies against FMDV and *Cl. Perfringens* toxins. These results confirm that genotype 1 is the most prevalent among this livestock population, showing a waver viral load.

Besides they present a different immune response against FMDV vaccination on these asymptomatic carriers animals.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I	Grado de positividad según el porcentaje de inhibición a las toxinas del <i>Clostridium perfringens</i> .	21
Cuadro II	Determinación de la carga proviral mediante <i>Real time</i> PCR de vaquillonas Holando en un año.	27
Figura 1	Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de Clostridios.	25
Figura 2	Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de Fiebre Aftosa.	26
Figura 3	Recuento leucocitario en los animales de los ensayos.	26
Figura 4	Carga proviral y título de anticuerpos anti BLV de vaquillonas holando durante 1 año.	28
Figura 5	Árbol filogenético de secuencias parciales del gen <i>env</i> del virus de la leucemia bovina (BLV).	30
Figura 6	Porcentaje de Inhibición anti <i>Clostridium perfringens</i> , determinado por ELISA de bloqueo.	33
Figura 7	Cinética de los títulos de anticuerpos contra la cepa A/24 Cruzeiro del virus de la Fiebre Aftosa.	35
Figura 8	Comparación en el día 15 días posvacunación (dpv) de anticuerpos totales por LPBE (A), IgG1 (B), IgM (C), IgG2 (D) e índice de avidéz (IA) (E) contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa	37

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la Leucemia Bovina Enzoótica (BLV) es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo. En Uruguay la prevalencia serológica en rodeos lecheros es muy alta, incluso en animales jóvenes, donde se ha reportado prevalencias de cerca del 50% (De Brun y col., 2013). El 90% de los animales infectados son asintomáticos (aleucemicos o con Linfocitosis persistentes) produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones importantes en el sistema inmune (Bartlett y col., 2013). En Uruguay no se ha calculado las pérdidas directas e indirectas 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 los Estados Unidos (Bartlett y col., 2013). El impacto del virus en la longevidad de la vaca también se ha visto que está asociada negativamente, de modo tal que vacas de rodeos con mayores títulos de anticuerpos contra BLV, tienen un 40% más de probabilidad de ser refugadas del rodeo (Bartlett y col., 2013).

BLV produce una infección crónica, a través de la integración del genoma viral en las células del huésped. El virus afecta células de la línea linfoide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie, además de monocitos y macrófagos. Una vez ocurrido la infección, el virus permanece en el animal de por vida, genera disturbios importantes en el sistema inmune y causa efectos negativos en la producción (Bartlett y col., 2014). El conocimiento exacto de la integración del virus en la célula huésped no está resuelto, sin embargo parece ser que existen varios sitios para la integración viral en lugares aparentemente preferidos en el genoma de la célula huésped. Por otro lado, utilizando técnicas de cuantificación de ADN, como la *Real Time* PCR, se ha observado distintos niveles de carga proviral en animales infectados en muestreos transversales (Somura y col., 2014). Lo que se desconoce con detalles hasta el momento, es si existen factores ambientales y de manejo, no vinculados a la resistencia genética intrínseca de los animales, que favorezcan a la fluctuación de estas cargas provirales en los animales a campo e infectados naturalmente. Entender esta dinámica y por cuánto tiempo los animales pueden permanecer con bajas cargas, es importante si consideramos que la

capacidad de transmisión viral entre bovinos, está influenciada por la carga proviral (alta o baja) del animal (Juliarena y col., 2016).

Por otro lado, esta clasificación de los animales en altas y bajas cargas provirales, podría tener relación directa sobre el efecto de BLV en las funciones del sistema inmune y los parámetros productivos y reproductivos de los animales infectados. En la actualidad, si bien existen algunas evidencias al respecto que demuestran asociaciones negativas en inmunizaciones de bovinos infectados con BLV o repercusión en la performance reproductiva de estos animales, estas asociaciones no son claras y requieren de mayores investigaciones con las herramientas actuales disponibles, sobre todo para categorizar animales infectados con este virus y poder realizar asociaciones con distintos niveles de cargas virales.

Por lo tanto, y partiendo de los antecedentes mencionados en los párrafos anteriores, en la presente propuesta se analizó la dinámica de la infección con BLV a lo largo del tiempo en animales portadores infectados naturalmente y por otra parte se investigó si BLV interfiere con la inmunización a campo de bovinos contra Clostridiosis y Fiebre Aftosa, ambas enfermedades sumamente trascendente para la producción nacional.

2. ANTECEDENTES

2.1 BLV: AGENTE ETIOLÓGICO

El Virus de la Leucemia Bovina (BLV) es un retrovirus exógeno que junto con el virus T-linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV) pertenece al género Deltaretrovirus, subfamilia Ortoretrovirinae, familia Retroviridae. Es un virus ARN que afecta a células de la línea linfóide, principalmente a los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M (IgM) en su superficie. Luego de la infección, el genoma de BLV se integra persistente del ADN viral al genoma celular (Poiesz 1995). El BLV también persiste en células como los monocitos y macrófagos (Burny y col., 1988; Aida y col., 1989; Kettmann y col., 1994).

El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARN de polaridad positiva unidos por su extremo 5' e integrado por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, los cuales son necesarios para su síntesis (OIE, 2018). El genoma completo consiste en 8714 nucleótidos. El gen *gag* codifica la producción de la proteína p24 de la cápside, siendo esta, el blanco de los anticuerpos generados por el hospedador. También codifica la proteína p15 de la matriz, que interactúa con la bicapa lipídica de la envoltura viral y la proteína p12 de la nucleocápside. Los genes *pol* codifican la transcriptasa reversa, una ADN polimerasa ARN dependiente, que transcribe el ARN en ADN copia, el cual se integra al genoma celular (Álvarez y Oriani, 2000).

Por último, el gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura, la gp51 de superficie y la gp30 transmembrana, involucradas en la infectividad del virus. La proteína *env* gp51 induce una expresión masiva de anticuerpos específicos en animales infectados (Gillet y col., 2007) y la mayor parte de las pruebas serológicas rutinarias detectan anticuerpos contra esta glicoproteína, ya que es de aparición temprana (OIE, 2018). La misma presenta un rol esencial en el ciclo viral, ya que es necesaria para el ingreso viral a la célula y es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes del virus (Mamoun y col., 1990). Además dicha región ha sido ampliamente utilizada para los estudios de genotipificación y se han demostrado recientemente por estudios filogenéticos que el BLV se puede clasificar en 10 genotipos (Lee y col., 2016).

2.2 VÍAS DE TRANSMISIÓN

El virus se transmite por vía horizontal y vertical, siendo la primera la principal vía de contagio. Los animales portadores asintomáticos son la fuente de infección en los rodeos. Esta transmisión se da por el pasaje linfocitos infectados con el virus de un bovino a otro. En las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados, transformando a estos en una fuente potencial de contagio (De la Sota, 2004). Su infectividad dependerá del recuento de linfocitos infectados en el fluido, el cual puede aumentar si ocurre un proceso exudativo (Hopkins y DiGiacomo, 1997). La mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo tanto cualquier medida de manejo o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, descorne, aplicación de inyectables, palpación rectal que se practiquen sin tomar medidas profilácticas correspondientes, son una importante forma de diseminación de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerickx y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Por otro lado, también se ha demostrado que insectos hematófagos pueden jugar un rol importante en la propagación del BLV. Datos publicados (Oshiro y col., 2013) indican que cuando estos insectos son controlados, se logra disminuir la infección a largo plazo. Vinculado a la capacidad de transmisión de un animal a otro, recientemente se ha propuesto dos perfiles o fenotipos de infección vinculados al polimorfismo del gen BoLA-DRB3, diferenciándose animales con alta y con baja carga proviral. Esto parece ser muy importante en la transmisión del virus, ya que animales con baja carga proviral, no serían una fuente de infección para rodeos libres de BLV (Juliarena y col., 2016). Finalmente, la transmisión vertical puede ocurrir en hasta un 15 % de los casos y tiene lugar cuando un animal infectado lo transmite a la progenie por vía transplacentaria o vía digestiva a través del calostro (Martín y col., 2000).

2.3 INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA

Luego de la transmisión de linfocitos infectados por el virus de un bovino infectado a uno libre de la enfermedad, la estrategia replicativa del BLV involucra en una primera fase, el reconocimiento específico de las proteínas externas de la envoltura viral por parte de la célula huésped y la penetración a través del mecanismo de

fusión (Brasseur y col., 1988). Luego en el citoplasma se sintetiza una copia de ADN complementario a partir del ARN viral utilizando la enzima transcriptasa reversa. Las secuencias presentes a ambos extremos del genoma viral se repiten en cada extremo del nuevo ADN dando lugar a los extremos terminales o LTRs. La nueva molécula de ADN penetra al núcleo celular, se duplica y circulariza integrándose al azar y en forma permanente al genoma celular en forma de provirus (Luciw y Leung, 1992).

Inmediatamente después de la infección, la expresión genética y la producción de viriones maduros se activa en la célula huésped y se puede identificar una viremia pasajera que dura de 10 a 12 días post-infección (Schwartz y col., 1994), después de lo cual aparece una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones activos en los órganos de los animales infectados.

Uno de los indicadores más tempranos de infección es el aumento de la respuesta humoral antiviral entre la primera y octava semana postinoculación. Los anticuerpos reconocen los epítopes de gp51 y p24 en la membrana celular y colaboran con la muerte de las células productoras de virus (Gillet y col., 2007).

Trabajos realizados en Argentina ponen en manifiesto que alrededor del 10 % de los animales nacen infectados y que no hay progresión de la infección hasta los 12 meses de edad. A partir del año, el nivel aumenta paulatinamente hasta alcanzar el 24% de animales infectados a los 27 meses, para luego elevarse a un 61% a los 36 meses, coincidiendo con el ingreso a la lactancia (Gutiérrez y col., 2011).

Es importante analizar si la carga proviral en animales infectados con BLV varía en el transcurso del tiempo ya que, teniendo en cuenta que BLV es un virus inmunodepresor e inmunomodulador que causa infección crónica e irreversible, si la carga proviral varía, también podría variar cuantitativamente el efecto negativo sobre la respuesta inmune de animales infectados crónicamente.

2.4 PRESENTACIONES DE LA ENFERMEDAD

Pueden distinguirse tres fases después del contagio con BLV:

A) Una fase inaparente, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y la producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales, principalmente la glicoproteína gp51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989).

B) Linfocitosis persistente (LP) desarrollada por un 30 a 70 % de los animales infectados con edades entre 3 y 6 años, que desde el punto de vista clínico son asintomáticos (Beier, 2008). Se define Linfocitosis persistente como un aumento en el recuento de linfocitos superior a 3 desvíos estándar sobre la media (Marshak., 1968) y se acepta como persistente al demostrar linfocitosis en 2 muestras analizadas separadas en el tiempo por un periodo de 60 a 90 días (Bendixen, 1963). Los animales con LP no presentan otro signo que valores anormales de linfocitos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos animales sufren un desorden inmunológico, con cambios en el tipo de respuesta de linfocitos TCD4, modificando el perfil de citoquinas presentes en los animales (Kabeya y col., 2001).

C) Enfermedad tumoral propiamente dicha presente entre un 0,1% y 10% de los animales infectados y es la forma irremediamente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988). Suele manifestarse entre los 5 y los 8 años, en un bajo porcentaje de la población (Chamizo, 2005). La sintomatología causada por el linfosarcoma tiene un comienzo muy insidioso y pueden llevar a la muerte del animal al principio o al final del curso de la enfermedad. Se observa astenia, adelgazamiento, disminución del apetito, fatiga, disminución del rendimiento lácteo y anemia, entre otros signos. Las adenopatía o tumefacciones ganglionares constituyen el signo característico, no siempre simétricas ni generalizadas (De la Sota, 2004). Los síntomas dependen del lugar donde aparecen los tumores (OIE, 2018). Estas lesiones pueden determinar una serie de trastornos funcionales de origen mecánico como compromiso de los bronquios, disnea, compresión del nervio vago, del esófago produciendo meteorismo crónico, del corazón con edemas e hidropesías del timo, de médula espinal con parálisis posterior, y afectación de los ojos con producción de exoftalmia.

2.5 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL BLV

Los mecanismos más frecuentes para generar variabilidad genética son la mutación y la recombinación. La mutación es un mecanismo clave en la generación de variación genética en los virus cuyo genoma está constituido por ARN. Ésta, es responsable de la generación de gran número de variantes virales en el curso de una infección (Bartenschlager y Lohmann 2000). Muchas variantes sobreviven, generando variantes diferentes en un mismo hospedero infectado. A este conjunto de

variantes genéticas estrechamente relacionadas se le denomina cuasiespecies virales (Eigen y col., 1981).

El BLV es clasificado filogenéticamente en 10 genotipos que circulan en varias regiones del mundo, basándose en el genoma completo y en las secuencias del gen *env* gp51. El genotipo 1, 4 y 6 se encuentran distribuidos por todo el mundo, siendo el genotipo 1 el más dominante y está distribuido en Europa, América, Asia y Australia. Tanto América del Sur como América del Norte tienen altas prevalencias del genotipo 1. Otros genotipos se encuentran restringidos alguna región como por ejemplo el genotipo 2 que solo se encuentra en Sudamérica y el genotipo 8 solo en Europa. Moratorio y col. (2010), detectaron siete genotipos de BLV circulando en bovinos de la región. Por lo tanto en América del sur encontramos una amplia variedad de genotipos (1, 2, 4, 5, 6, 7, y 9), detectándose en los países de la región como Argentina los genotipos 1, 2, 4 y 6, en Brasil 1, 2, 5, 6, y 7, en Chile genotipos 4 y 7, en Perú y Paraguay los genotipos 1, 2 y 6, en Bolivia los genotipos 1, 2, 6 y recientemente el genotipo 9 (Polat y col., 2016; 2017). En Uruguay hasta el momento únicamente se ha reportado el genotipo 1 (Moratorio y col., 2010). Un nuevo genotipo (el 10) fue recientemente detectado en países de Asia (Polat y col., 2017).

Análisis filogenéticos de genomas BLV completos demostraron que cada genotipo de BLV está codificado por sustituciones específicas de aminoácidos en regiones de genes estructurales y no estructurales (Polat y col., 2017).

La presencia de diferentes poblaciones virales en un mismo hospedero, sean variantes que conforman al espectro de cuasiespecies o cepas de diferentes genotipos que coinfecten a una misma célula, abre la posibilidad de otro mecanismo de generación de diversidad genética denominado recombinación. Ésta, consiste en la generación de nuevas estirpes a través de diferentes combinaciones genéticas entre variantes distintas (Worobey y Holmes, 1999). Cuando la recombinación ocurre entre variantes de distintos genotipos que circulan simultáneamente en la misma célula, pueden originar cepas con mayor capacidad de replicación, de más fácil transmisión o más virulentas (Salminen, 1995).

El análisis y estudio de la variabilidad genética de BLV en diferentes zonas geográficas puede ser de gran interés para la medicina veterinaria, ya que involucra aspectos relacionados con la patogenicidad, diagnóstico y eventualmente el desarrollo de nuevas estrategias de manejo animal, así como una posible vacuna contra esta enfermedad.

Si bien ha sido demostrada la existencia de variantes genéticas de *Tax* que determinan algunas diferencias en el comportamiento biológico del BLV (Dube y col., 2009), hasta el momento no se han vinculado variantes naturales en la genética del virus asociadas a las diferentes expresiones clínicas de la enfermedad. Estudios recientes vinculan la heterogeneidad genética de la estirpe de BLV infectante con el proceso de leucemogénesis desarrollado (Inoue y col., 2011). Por otro lado, algunos autores han correlacionado distintos aspectos de la genética bovina con una posible resistencia a la enfermedad (Rodríguez y col., 2011).

Diferencias en la infectividad del virus, diseminación y progresión de la enfermedad son atribuidas a pequeños cambios en ácidos nucleídos que componen la proteína de envoltura (*env*) (Benavides y col., 2017). Dicho gen *env* es apropiado para realizar los análisis filogenéticos (Rodríguez y col., 2009). Algunas mutaciones en nucleótidos o sustituciones de aminoácidos pueden afectar la habilidad del BLV en sobrevivir e infectar el huésped (Lee y col., 2015). Para aproximarnos a entender la patogenia de la enfermedad causada por el BLV, es de fundamental importancia el análisis y estudio exhaustivo de los genomas virales. Entorno a esta variabilidad lo que no se sabe es si existe varios genotipos afectando una misma población de animales y si hay variaciones de los genotipos predominantes a lo largo del tiempo, que pudiera explicarse por algún tipo de presión selectiva como puede ser la presión que ejerce el sistema inmune sobre los animales infectados.

2.6 IMPORTANCIA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA

El virus de la Leucemia Bovina Enzoótica (BLV) es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo, y es el agente causal de la Leucosis Bovina Enzoótica con significativas pérdidas económicas (Bartlett y col., 2013). En Uruguay no existen datos precisos de la prevalencia de la LBE, pero se estima de hasta 77% en vacas lecheras, pudiendo llegar a 95% si se consideran animales mayores a 4 años (Zaffaroni y col. 2007). La prevalencia serológica en rodeos lecheros es muy alta, incluso en animales jóvenes, donde hemos encontrado prevalencia de cerca del 50% (De Brun y col., 2013).

Las pérdidas por este virus, pueden ser directas e indirectas; las mismas pueden ser por la mortalidad por los linfosarcomas propiamente dichos, por la reducción de la producción de leche, el aumento de la tasa de refugo, así como por el aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades debido al desorden inmunológico que provoca

(Emanuelson y col., 1992; Erskine y col., 2012; Bartlett y col., 2014; Norby y col., 2016), siendo el impacto de la infección por BLV, probablemente mayor al que realmente podemos apreciar a nivel de campo. Por otra parte, la pérdida quizás más visible y significativa en el sector exportador, es la importante barrera sanitaria para el comercio internacional de animales en pie que existe por la infección con este virus. En este sentido, muchos países que importan animales desde Uruguay, exigen la serología negativa, aún siendo un país con la infección presente.

No se ha calculado en Uruguay las pérdidas directas e indirectas que produce la presencia de esta infección. 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 los Estados Unidos (Bartlett y col., 2013). El impacto del virus en la longevidad de la vaca también se ha visto que está asociada negativamente, de modo tal que rodeos con mayores prevalencias de anticuerpos contra BLV tienen un 40% más de probabilidad de ser refugada las vacas (Bartlett y col., 2013).

Por lo tanto, y desde el punto de vista sanitario y económico, la infección con BLV tiene un impacto significativo por los costos en diagnóstico, descarte de animales, disminución de los índices productivos, impacto en índices reproductivos, tratamientos de patologías concomitantes, disfunción del sistema inmune, entre otros.

Diferentes ensayos revelan que los parámetros reproductivos no se vieron afectados directamente por BLV (Langston y col., 1978; Huber y col., 1981; D'Angelo y col., 1997). Aunque Chi y col. (2002) obtuvieron en Canadá que vacas seropositivas a BLV, tienen una tendencia a la asociación negativa con intervalo interparto (IIP) comparado con vacas seronegativas a BLV y un alto riesgo de IIP prolongado en vacas de primera lactación. Otros ensayos realizados en sistemas de producción de leche, encontraron que vacas infectadas con BLV, requerían más servicios por concepción (García y col., 2000). En este mismo sentido, VanLeeuwen y col. (2010) demostraron en ganado lechero de diferentes estados de Canadá, que la seropositividad al BLV está ligeramente asociado a IIP prolongado y un alto riesgo de IIP prolongado en vacas de primera lactación. También que las vacas positivas a BLV tienen una tasa del 7 % inferior de concepción, comparado con vacas seronegativas. En nuestro grupo de trabajo se obtuvo una tasa del 27% menos de concepción en las vaquillonas holando seropositivas, durante un período

reproductivo determinado (Noviembre - Diciembre), pero no así en el otro periodo reproductivo (Junio - Julio) en el mismo establecimiento (Puentes y col., 2016).

El BLV no sólo causa inmunodepresión sino que además genera disturbios inmunológicos a nivel de la inmunidad celular, modificando el perfil de las células T (Frie y Coussens, 2015), que son claves en la regulación del sistema inmune tanto en infecciones naturales como en la respuesta a inmunizaciones por vacunación. Estas alteraciones del sistema inmune podrían tener un impacto negativo en la capacidad de ganado para resistir al avance de la enfermedad infecciosa o a la respuesta a vacunas; en este mismo sentido algunos estudios reportaron una correlación positiva entre BLV y otras enfermedades (Emanuelson y col., 1992; Trainin y col., 1996) o cuestionaron la habilidad de bovinos infectados con BLV para responder inmunológicamente contra otros patógenos (Erskine y col., 2011; Frie y col., 2016). Como por ejemplo disminución de la función de los polimorfonucleares *in vitro* inducido por *Escherichia coli* (*E. coli*) en vacas infectadas (Souza y col., 2012). Además se ha demostrado que vacas infectadas con BLV, particularmente con LP, presentan la apoptosis de neutrófilos y monocitos inhibida (Blagitz y col., 2017). Erskine y col. (2011) en ensayos a campo, encontraron que vacas inmunizadas con una vacuna comercial conteniendo *Escherichia coli* (vacuna utilizada contra la mastitis), produjeron un título significativamente menor de IgG2 cuando estaban infectadas con BLV. Además trabajos de Frie y col. (2016) apoyan la hipótesis de que hay una falla en la repuesta a la vacunación en animales BLV+, ya que encontraron que vacas BLV+ producían significativamente menores títulos de IgM contra BoHV-1 y *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona* y menos títulos de IgG2 contra BoHV-1 comparadas con las vacas BLV-.

2.7 BLV Y LA RESPUESTA INMUNE

El BLV a pesar de generar una importante respuesta antiviral, persiste indefinidamente a lo largo de la vida del animal, aparentemente en un estado de transcripción silenciado, por lo menos en una proporción de células infectadas. Luego de la infección, la actividad humoral y citotóxica detiene eficientemente el ciclo replicativo del virus, pero permite la expansión mitótica de aquellas células que contienen el provirus (Florins y col., 2007).

La respuesta humoral es la primera en participar luego de la infección. Anticuerpos contra varias proteínas virales pueden detectarse dentro de días o semanas después de exponerse al virus (Bumy y col., 1980). Se sintetizan anticuerpos que reconocen los epítopes estructurales (gp51 y p24) y proteínas regulatorias (Tax y Rex) (Florins y col., 2007). Gutiérrez y col. (2012) encontraron que la respuesta humoral refleja los niveles de infección *in vivo* siendo una estrategia epidemiológica para rodeos de alta prevalencia.

Los animales seropositivos a BLV en fases tempranas de la infección, desarrollan una respuesta celular a predominio de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), con producción de interferón gamma. En fases más crónicas con presencia de linfocitosis persistente (LP), se produce una respuesta Th2 con producción de IL4 e IL10 fundamentalmente. Las alteraciones en la expresión de citoquinas ha mostrado estar correlacionadas con la progresión de la enfermedad en infecciones crónicas por retrovirus, sugiriendo que el balance de las citoquinas puede contribuir a la progresión de la enfermedad. Pyeon y col. (1996) examinaron los perfiles de citoquinas en células mononucleares de bovinos de cada estadio de la enfermedad y demostraron que la producción de citoquinas Th1 como IL2, eran promovidas en animales serológicamente positivos aleucemicos más que en aquellos con LP. Los animales serológicamente positivos también expresaban mas IL12, clave para una respuesta Th1, pero esta disminuía en estadios más avanzados (Yakobson y col., 1998). Sin embargo, el aumento en la expresión de citoquinas Th2 como IL10, se detectó en macrófagos de animales con LP. Se cree que IL2 juega un rol en la progresión de la enfermedad, provocando la proliferación de linfocitos B, contribuyendo a la LP inducida por el virus (Trueblood y col., 1998). La susceptibilidad a la expansión clonal de los linfocitos B infectados por el virus está asociada con alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (Nagaoka y col., 1999).

Adicionalmente, las células T infectadas con el BLV aumenta la expresión de receptores inmunoinhibitorios, lo que aumenta la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo aumentando la expresión de IL-10 o disminuyendo la de INF gamma. La expresión de los receptores inmunoinhibitorios esta correlacionado positivamente con la carga proviral (Bartlett y col., 2014).

2.8 FIEBRE AFTOSA Y CLOSTRIDIOSIS: INTERÉS PRODUCTIVO

Uruguay es un país agropecuario donde la ganadería implica un 48% de la producción de este sector (DIEA 2017). En la producción ganadera, tanto la Fiebre Aftosa como las Clostridiosis son enfermedades sumamente trascendentes para la producción nacional. Las enfermedades clostridiales constituyen una amenaza constante en la cría de ganado bovino, causando diversas afecciones como “mancha”, “gangrena gaseosa”, enterotoxemias, hemoglobinuria bacilar, hepatitis necrótica, tétanos y botulismo. En cuanto al *Clostridium perfringens*, bacteria anaeróbica, los más importante en medicina veterinaria son el tipo C y D. El primero (C) produce las toxinas alfa y beta que causa severas enteritis y el segundo (D) produce las toxinas alfa y épsilon causantes de enterotoxemias, siendo estas tres toxinas las más importantes en la patogénesis de enfermedades severas para los animales de granja (Moreira y col., 2016). Para el estudio de la potencia de las vacunas y de la respuesta generada, se puede demostrar la presencia de anticuerpos anti-toxinas alfa, beta o épsilon mediante la prueba de neutralización en ratones o mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, ensayos comerciales para las toxinas letales no están disponibles fácilmente para el diagnóstico en laboratorios (Simpson y col., 2018). Se ha validado la seroneutralización *in vitro* en líneas celulares MDCK para la titulación de la toxina épsilon del *Cl. perfringens*, siendo esta una técnica sensible y específica además de rápida y no necesita la utilización de animales (Salvarini y col., 2010; Souza y col., 2010).

Existen diversos cuestionamientos a nivel veterinario sobre la eficacia de las vacunas comercializadas en nuestro país. Sin embargo, el foco de la atención sobre este aspecto, ha estado centrada sobre todo en la composición y fabricación de las vacunas y no tanto a las posibles fallas inmunológicas por infecciones virales crónicas que cursan con inmunodepresión como es el caso de BLV, que está ampliamente difundida en nuestro país.

Por otro lado, en lo que se refiere a la Fiebre aftosa, si bien Uruguay es un país libre de la enfermedad, esta es quizás la principal barrera sanitaria a la exportación de carne. Es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa, vírica, aguda, febril, que afecta a biungulados caracterizada por causar lesiones vesiculares en mucosa de boca, canal digestivo, pezones y espacio interdigital y degeneración hialina en

músculos cardíacos y estriados. El agente causal de la misma es un *Picornaviridae* del género *Aphthovirus*, del cual hay siete tipos en el mundo: A, O, C, SAT1, 2 y 3 y Asia 1 (Lüchter, 2004). Actualmente el status sanitario del Uruguay ratificado por la “OIE” desde el 2003 es de “País Libre con vacunación” (Estatus sanitario animal del Uruguay, MGAP). Para el mantenimiento de dicho status, implica revención con inmunizaciones y controles de vigilancia que implican un gasto relevante para el estado. Por lo tanto la vacunación es obligatoria y decisiva para el mantenimiento del status como país libre. En ese contexto es importante conocer si BLV interfiere con la respuesta inmune contra Fiebre Aftosa. En Argentina, Trotta y col. (2015) estudiaron la inmunización simultánea en ganado bovino contra FA y anthrax (*Bacillus anthracis*) encontrando que no interfiere en la respuesta de refuerzo de la fiebre aftosa, pero no se ha estudiado que efecto conlleva la vacunación de FA con un animal portador a una enfermedad inmunosupresora.

Estos resultados permitirán discutir y realizar hipótesis sobre medidas a tomar para mejorar el estado inmunitario de los animales previo a la vacunación, considerando la alta difusión que tiene BLV en todo el país.

3. HIPÓTESIS

La carga proviral de BLV en animales infectados varia a lo largo del tiempo y la respuesta inmune humoral en animales vacunados contra *Clostridium perfringens* y contra la Fiebre Aftosa en términos cualitativos y cuantitativos difieren cuando los animales están infectados con BLV.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

Determinación de la carga proviral y análisis de la variabilidad genética de bovinos infectados naturalmente con el virus de la Leucemia bovina enzoótica (BLV) y evaluación del impacto sobre la respuesta inmune contra vacunas de interés productivo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la carga proviral de BLV mediante *Real time* PCR en vaquillonas holando infectadas naturalmente en seriadas sangrías durante un periodo de doce meses.
2. Analizar la variabilidad genética de BLV y determinar los genotipos circulantes en un rodeo a lo largo del tiempo y a nivel poblacional en bovinos infectados naturalmente.
3. Evaluar el título de anticuerpos totales frente a la inmunización contra las toxinas alfa, beta y épsilon del *Clostridium perfringens* en vaquillonas libres e infectadas con BLV.
4. Evaluar el título de anticuerpos total, diferencial (IgM, IgG1 e IgG2a) e índice de avidéz frente a la inmunización contra la Fiebre Aftosa en vaquillonas libres e infectadas con BLV.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Establecimiento de estudio

El estudio se llevó a cabo en un establecimiento del Departamento de Florida, Uruguay (coordenadas: 33°55' 45" S 56°14' 06" O y 33°55' 45" S 56°14' 06" O), donde se realiza la cría de terneras de raza Holando de diferentes productores de la zona (Departamentos de Florida y San José). Los animales ingresan con aproximadamente 6-8 meses de edad y permanecen en el campo alrededor de 18 meses hasta su regreso al productor original con 7 meses aproximadamente de gestación. El establecimiento no tiene exigencias sanitarias en cuanto al ingreso de animales con serología positiva a Leucosis Bovina Enzoótica.

Al ingreso, son identificadas con una caravana que indica el productor y el número asignado al animal. Luego son pesadas, desparasitadas y sometidas a un plan sanitario pre establecido (desparasitaciones, prueba de la tuberculina, vacunaciones: RB51, Carbunco, Queratoconjuntivitis, Clostridios, Fiebra Aftosa). Durante los primeros 30 días los animales de los distintos productores se encuentran en un mismo lote de "cuarentena" sobre pasturas. Posteriormente y según el peso, ingresan en lotes al rodeo general de aproximadamente 5000 animales (integrado por un total de 108 productores). La cría de los mismos es realizada sobre campos mejorados, praderas, verdes y con el suplemento de grano húmedo y heno en la época de menor oferta de forraje y a las categorías que lo requieren. El manejo reproductivo del establecimiento se realiza en dos periodos al año, Junio-Julio y Noviembre-Diciembre. Consiste en sincronización de las vaquillonas, detección de celo visto dos veces por día, inseminación artificial (IA) (hasta tres por animal), repaso con toros luego de cada periodo de IA y diagnóstico de gestación.

Como medidas higiénico-sanitarias habituales se sumergen en desinfectantes las agujas de las jeringas multidosis, material de descorne, material quirúrgico, guantes, o cualquier material que entre en contacto con sangre.

5.2 Aprobación de la Comisión de Bienestar Animal

Para los experimentos de esta tesis de maestría y la justificación del uso de animales, se contó con la aprobación del protocolo experimental por parte de la Comisión Honoraria de experimentación animal - CHEA (Exp. 111100-000068-15).

5.3 Estatus serológico a BLV

Se utilizó la técnica ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima) para detección de anticuerpos con un kit comercial. El mismo detecta anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del virus de BLV en suero bovino con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA, aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizándose 50 µl de suero con dilución 1:25. La lectura se realizó a una longitud de onda (λ) de 620 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, y se estableció la línea de corte para cada placa a partir del promedio de las lecturas de las densidades ópticas (D.O) de estos sueros controles.

5.4 Materiales y métodos para el objetivo específico número 1:

“Determinar la carga proviral de BLV mediante *Real time* PCR en vaquillonas holando infectadas naturalmente en seriadas sangrías durante un periodo de doce meses”

5.4.1 *Real time* PCR (qPCR) con SYBR Green para el gen *pol* BLV

Para determinar la carga proviral del BLV en vaquillonas holando se utilizaron dos grupos de animales, uno de 20 animales seropositivos a BLV (BLV+) y otro de 15 animales seronegativos a BLV (BLV-) perteneciente a 11 productores diferentes usuarios del campo de estudio descrito en el punto 5.1. Se extrajo sangre con anticoagulante de todo los animales por venopunción de la vena coccígea. Para el grupo BLV+ se realizó la cuantificación de ADN proviral mediante qPCR el día de inicio del experimento y a los 365 días, mientras que en los animales BLV- solo se realizó a los 365 días.

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de sangre periférica, utilizando el método de Fenol-Cloroformo. Una vez obtenido el ADN, se cuantificó mediante NanoDrop™ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa.

Para la qPCR se utilizó un equipo *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* siguiendo el protocolo descrito por Rola-Luszczak y col. (2013) utilizando las siguientes secuencias de *primers*: 5'CCT CAA TTC CCT TTA AAC TA-3' (*Forward*), y 5'- GTA CCG GGA AGA CTG GAT TA- 3' (*Reverse*). La técnica se realizó mezclando 12,5ul del kit *Fast start SYBR green* (ROCHE), 0.8ul de primer *Forward* (10uM), 0.8ul de primer *Reverse* (10uM), 5ul de ADN (100 ng/ul) y 3,5ul agua destilada ultrapura. Las condiciones de corrida fueron: una predesnaturalización de 2 min a 50°C, luego desnaturalización de 10 min a 95°C seguidas de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 55°C y una extensión final de 1 min a 60°C. Los resultados fueron visualizados en el software que acompaña el equipo y se clasificaron a los positivos en animales de alta y baja carga viral siendo el punto de corte 2000 copias/ug de ADN (Gutierrez y col., 2011).

5.4.2 Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos y la carga proviral de BLV fueron analizados mediante estadística descriptiva, se calcularon las medias y el desvío estándar para la carga proviral al inicio y final del estudio y se realizó un análisis de varianza (ANOVA one way) utilizando el software STATA v 14.

5.5 Materiales y Métodos para el objetivo específico número 2:

“Analizar la variabilidad genética de BLV y determinar los genotipos circulantes a lo largo del tiempo a nivel poblacional en bovinos infectados naturalmente”.

5.5.1 Detección de BLV mediante *Nested polymerase chain reaction* (nPCR)

Con el fin de obtener una banda de amplificación del BLV para luego secuenciar, se utilizaron 11 muestras de animales seropositivos a BLV perteneciente a 11 productores diferentes usuarios del campo de estudio descrito en el punto 5.1. Las

muestras de los mismos animales se tomaron al inicio del experimento (Día 0) y al final del experimento (Día 365) para realizar la nPCR.

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de sangre periférica, utilizando el método de Fenol-Cloroformo. Una vez obtenido el ADN, se cuantificó mediante NanoDrop™ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa. Se realizó la nPCR para obtener el producto de amplificación que luego se envió a secuenciar. Para la nPCR, se realizaron dos rondas de amplificación de un fragmento del gen *env* del BLV. Los *primers* utilizados en la primera ronda fueron: *env* 5032 Forward: 5'-TCT GTG CCA AGT CTC CCA GATA-3'; *env* 5608 Reverse: 5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA-3' mientras que los utilizados en la segunda ronda (anidada) fueron: *env* 5099 Forward: 5'- CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T-3'; *env* 5521 Reverse: 5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G-3'. Se utilizaron protocolos de amplificación descritos previamente que produjeron fragmentos de 598 bp para la primera ronda y de 444 pb para la segunda ronda. Este último producto, esperado en los animales positivos, fue visualizado en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, teñido con *Good View Nucleic Acid Stain* (Fechner y col., 1996). Se sembró también como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100 pb. La corrida fue realizada durante 30 min a 90 voltios (V). Por último los geles se visualizaron en un visualizador de geles con luz ultravioleta.

5.5.2 Secuenciación y análisis filogenético del gen que codifica para la proteína de envoltura gp51 de BLV

Con el fin de analizar la variabilidad genética de BLV y determinar si existen distintos genotipos virales circulantes, se procedió a la secuenciación automática de los productos obtenidos de la *nested* PCR que se corresponde a una porción del gen que codifica para la proteína gp51 de 444 pares de bases. Se enviaron a secuenciar ambas hebras de ADN a la empresa Macrogen - Corea. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MUSCLE (Robert C., 2004) y una vez obtenido el alineamiento, se utilizó el programa MEGA (Kumar y col., 2018) para identificar el modelo evolutivo óptimo para describir al conjunto de secuencias y posteriormente construir árboles filogenéticos basados en el método de máxima verosimilitud, con en el modelo Kimura de 2 parámetros mediante el programa. Se utilizó una distribución de Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutivas

entre sitios [2 categorías (+ G, parámetro = 0,3720)]. El análisis involucró 62 secuencias de nucleótidos, de las cuales 19 pertenecían al presente estudio. Se analizaron un total de 323 posiciones nucleotídicas en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA X (Kumar y col., 2018).

5.6 Materiales y Métodos para los objetivos específicos números 3 y 4:

- **Evaluar el título de anticuerpos totales frente a la inmunización contra las toxinas alfa, beta y épsilon del *Clostridium perfringens* en vaquillonas libres e infectadas con BLV.**
- **Evaluar el título de anticuerpos total, diferencial (IgM, IgG1 e IgG2a) e índice de avidéz frente a la inmunización contra la Fiebre Aftosa en vaquillonas libres e infectadas con BLV**

5.6.1 Conformación de los grupos de animales para los ensayos 3 y 4

Se tomaron muestras de sangre por venopunción de la vena coccígea de 78 bovinos Holando de aproximadamente 6 a 8 meses de edad y sin antecedentes de vacunación contra Clostridios y Fiebre aftosa. Los mismos pertenecían a un campo de cría de ganado Holando ubicado en el departamento de Florida - Uruguay descrito en el punto 5.1. Las muestras fueron extraídas en tubos con y sin anticoagulante y almacenadas a – 20 °C hasta su procesamiento.

Se conformaron los siguientes grupos de estudio:

- 1) Negativos a BLV (n= 10 para el ensayo con Fiebre Aftosa y n= 19 animales para el ensayo con Clostridiosis).
- 2) Positivos a BLV (n= 20 para el ensayo con Fiebre Aftosa y n= 29 animales para el ensayo con Clostridiosis).

En el caso de Fiebre Aftosa, los animales que seroconvirtieron durante el ensayo (n=5) fueron considerados como un tercer grupo y se denominó SC (Seroconversión).

A todos los animales se les realizó un hemograma a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el fin de detectar animales con

leucocitosis o linfocitosis persistente al inicio del experimento, utilizando el protocolo descrito por Marshak (1968).

El estado para BLV se realizó por serología utilizando la técnica de ELISA (descrita en la sección 5.3) y por PCR convencional (descrita en la sección 5.5.1) y en *Real time* PCR (descrita en la sección 5.4.1).

5.6.2 Inmunización contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis

Una vez obtenido los grupos de animales según el estado para BLV, se procedió a la inmunización con vacunas comerciales contra Fiebre Aftosa (cepas O1 Campos y A24/cruzeiro con ayudante oleoso) y Clostridiosis (Bacterina - toxoide). El campo de recría realiza estratégicamente la inmunización contra Clostridiosis al ingreso de los animales al campo y una revacunación a los 30 días. Se procedió a la inmunización con una vacuna comercial que contenía bacterinas y toxoides para la prevención de Clostridiosis provocadas por *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens* tipo B y C, *Clostridium perfringens* tipo D. Se administró una dosis de dos mililitros vía subcutánea en la tabla del cuello al día 0 y una revacunación a los 30 días posteriores para clostridios. La extracción de sangre se realizó en el momento de la primo-vacunación (día 0), y luego a los 30, 60, 90, 180 y 365 días posvacunación (dpv).

En el caso de la Fiebre Aftosa, la legislación vigente obliga la vacunación de todos los animales menores de dos años (categoría que se utilizó en este experimento) en el mes de mayo. En este caso se comenzó el experimento de forma coordinada para lograr una muestra cero (día 0) en la primoinmunización y posteriormente la extracción de sangre los días 15, 60, 165 y 300. Todos los animales recibieron una única dosis de dos mililitros de la vacuna comercial utilizada en el país vía subcutánea en la tabla del cuello conteniendo las cepas O1 campos y A24 cruzeiros. Se inició este experimento con un desfase con la inmunización contra Clostridios de al menos 60 días, para minimizar la interferencia entre ambas vacunaciones.

5.6.3 Detección de anticuerpos anti toxina alfa, beta y épsilon de *Clostridium perfringens* mediante ELISA.

Para evaluar la respuesta a la vacunación contra la toxina alfa, beta y épsilon de *Cl. perfringens*, se utilizaron kits comerciales de ELISA de bloqueo para detectar anticuerpos bovinos específicos a dichas toxinas (Bio-X Diagnostics BIO K 291/2, BIO K 317 BIO K 222/2, Bélgica). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura de densidad óptica se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Los resultados fueron calculados como el porcentaje de inhibición (% inh) de cada toxina: (D.O negativos – D.O positivos)/ D.O negativos*100, expresando el título de anticuerpos y determinando el grado de positividad según las indicaciones del fabricante observadas en la Cuadro I.

Cuadro I. Grado de positividad según el porcentaje de inhibición a las toxinas del *Clostridium perfringens*.

Valor calculado	Nivel de positividad
%inhibición <20	0
20≤%inh<40	+
40≤%inh<60	++
60≤%inh<80	+++
%inh ≥80	++++

5.6.4 Seroneutralización (SN) *in vitro* para la cuantificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *Clostridium perfringens*.

Para cuantificar los títulos de anticuerpos neutralizantes contra *Cl. perfringens*, se utilizó la técnica de SN *in vitro* en la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) según lo descrito anteriormente (Souza y col. 2010; Salvarani y col., 2013). La misma se llevó a cabo en la Universidad Federal de Minas Gerais-Brasil en el marco de un convenio con la Universidad de la República. Para el grupo BLV - (n = 19 animales), fueron procesados tres pools de cuatro animales y un pool de 7 animales, conteniendo por pool, 100 µL de suero por muestra. En el grupo BLV+ (n=29), fueron procesados 6 pools de cuatro animales y otro pool de cinco animales,

conteniendo cada pool 100 μL de suero por muestra. El límite de detección de anticuerpos del ensayo fue de 0.4 UI/mL, considerándose a los pools de sueros con concentraciones menores a 0.4 UI/mL como cero UI/mL. Se cuantificaron los anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon del *Cl. perfringens* en células MDCK. Brevemente para la SN *in vitro*, 50 μL de cada pools de sueros, se mezclaron con 50 μL de L +/50 de la toxina. Las placas fueron homogeneizadas, reincubadas y se le agregaron suspensiones celulares de 2.5×10^4 células en 50 μL . Como control positivo se utilizaron 100 μL de la toxina más 50 μL de células mientras que el control negativo 100 μL de medio MEM y 50 μL de células. Las placas se incubaron a 37°C en un lugar húmedo con una atmósfera controlada (5% de CO₂ y 95% de O₂) durante 48 horas y el sobrenadante se eliminó después de este período. La tinción se realizó con 100 μL de la solución de cristal violeta para observar el efecto citopático (ECP) (Souza y col., 2010). El límite de detección del ensayo fue de 0.4 UI/mL, por lo tanto sueros menores a 0.4 UI/mL no tienen reacción protectora.

5.6.5 Detección de anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) mediante ELISA en fase líquida.

Los anticuerpos totales contra el VFA se determinaron por un ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) en el laboratorio de Virología de INTA Castelar – Argentina con la cooperación de la Dra. Alejandra Capozzo. Se utilizaron los protocolos descritos por Lavoira y col. (2012). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (*Immulon 2HB® plates - Nunc*) con 50 μL de suero policlonal de conejo anti-VFA. Las placas se incubaron durante 16 horas a 4°C y luego se bloquearon con 125 μL de PBS-T-ovoalbúmina bovina 1% (PBS-T-OVA) (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37°C. Las muestras de suero se prepararon en 6 diluciones en base 5 (1:5 a 1:15625) y se mezclaron con volúmenes iguales de una dilución de virus inactivado previamente titulado para este ensayo (dilución final de sueros 1:10 a 1:31250). Luego de una incubación de 1 hora a 37°C, 50 μL de las mezclas de suero y virus (fase líquida) se transfirieron a las placas *Nunc* sensibilizadas previamente y se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación. Seguidamente se colocó un suero policlonal de cobayo anti-VFA y luego un anticuerpo de cabra anti-cobayo (KPL®) conjugado. Las placas se revelaron con una mezcla

sustrato/cromógeno y los valores de densidad óptica se registrarán con un lector automático para microplacas Multiskan EX (Labsystems) utilizando una longitud de onda de 405nm.

Los títulos de anticuerpos fueron expresados como el log₁₀ de la inversa de la dilución de suero que otorga el 50% de densidad óptica del promedio de absorbancia de los pocillos control sin suero.

5.6.6 Detección de isotipos contra A24/Cruzeiro mediante ELISA

La determinación de los títulos de IgM, IgG1 e IgG2 contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa se realizó de acuerdo a Lavoria y col. (2012) y Bucafusco y col. (2014), utilizando un anti-IgM, anti-IgG1 (*Conjugate Sheep anti Bovine IgG1-HRP* (AbD Serotec AAI21P) y anti-IgG2 (*Conjugate Sheep anti Bovine IgG2-HRP* (AbD Serotec AAI22P) conjugado a peroxidasa (AbD Serotec, Oxford, UK), con el fin de determinar el perfil de respuesta inmune. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (MICROLON®, Greiner Bio-One, Monroe, NC) con 50 µl de una solución conteniendo 15 ng/pocillo de partículas 140S purificadas de la cepa A24/Cruzeiro del virus de la Fiebre Aftosa. Las muestras fueron procesadas por duplicado en diluciones seriadas a partir de 1:50. Los títulos fueron expresados como la inversa de la dilución que alcanzó el punto de corte (0,2) calculado como la media de la DO + 2SD del suero negativo control (suero bovino proveniente de la Patagonia Argentina, zona libre de Fiebre Aftosa sin vacunación).

5.6.7 Índice de avidéz (AI) de los anticuerpos contra Fiebre Aftosa mediante ELISA

La evaluación de avidéz de los anticuerpos específicos se realizó a los 15 días post inmunización utilizando la técnica de ELISA descrita previamente por Lavoria y col. (2012) con el fin de poder determinar la calidad de la respuesta inmune. El índice de avidéz (AI) se calculó como el porcentaje de actividad residual de la muestra de suero después de una etapa de lavado con urea por 20 min, comparado con el de la muestra no tratada: $AI (\%) = (DO \text{ muestra con urea} / DO \text{ muestra sin urea}) \times 100$.

5.6.8 Análisis estadísticos

Para el análisis de los títulos obtenidos anti-toxinas *Cl. Perfringens* se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y el nivel de significancia fue de $p < 0.05$ y los valores de p comprendidos entre 0,05 y 0,10 se consideraron como tendencia. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software). Para comparar las técnicas de diagnóstico ELISA y SN *in vitro*, se utilizó el programa de libre acceso WinEpi y se calculó el coeficiente Kappa.

Para el ensayo con la vacunación contra Fiebre Aftosa se utilizó el “porcentaje esperado de protección” (EPP) como respuesta protectora inducida por la vacuna. El EPP relaciona el título de anticuerpos medidos por LPBE al día 60 post inmunización con los porcentajes obtenidos para la protección de los mismos grupos de animales después del desafío realizado al día 90 utilizando el test de “protección contra la infección generalizada de la pezuña”. Los títulos LPBE correspondientes al valor $EPP = 75\%$ ($EPP - 75\%$) es 1.90 para la cepa A24/Cruzeiro (Maradei y col., 2008; Robiolo y col., 2010). Los títulos de anticuerpos obtenidos fueron graficados y los resultados entre los grupos experimentales fueron comparados por ANOVA con medidas repetidas, seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. El test de Mann-Whitney fue usado para comparar los resultados de los grupos. Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software).

6. RESULTADOS

6.1 Anticuerpos totales contra BLV y resultados de los hemogramas

Los grupos BLV + y BLV - permanecieron seropositivos y seronegativos respectivamente durante todo el experimento, mientras que los animales del grupo SC del ensayo de Fiebre Aftosa, seroconvirtieron durante el ensayo entre el día 15 y 150 del experimento (Figura 1 y 2). Ningún animal presentó leucocitosis o linfocitosis al comienzo del experimento, lo que fue confirmado por los hemogramas en leucocitos de sangre periférica (Figura 3).

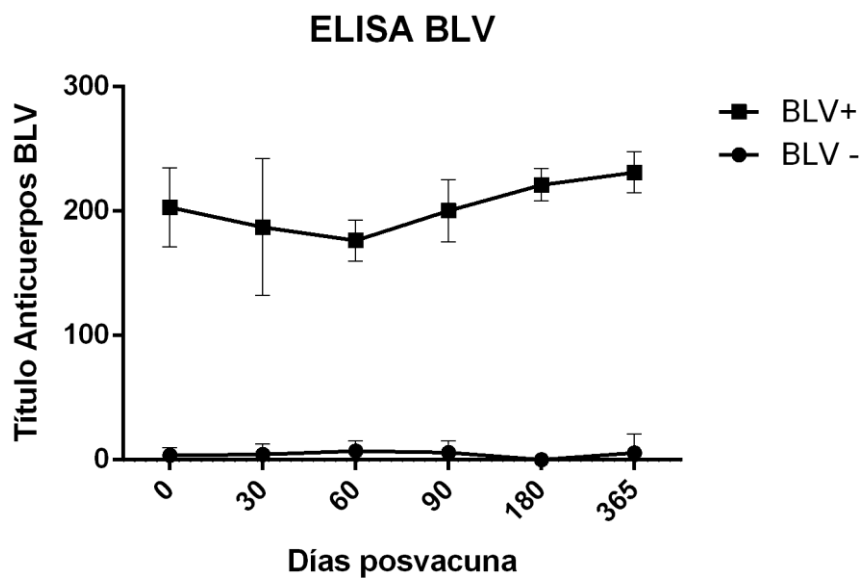


Figura 1. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de Clostridios. Para cada media se muestra el error estándar (SEM). El grupo BLV - (19) y BLV + (29) permanecieron negativos y positivos durante todo el ensayo.

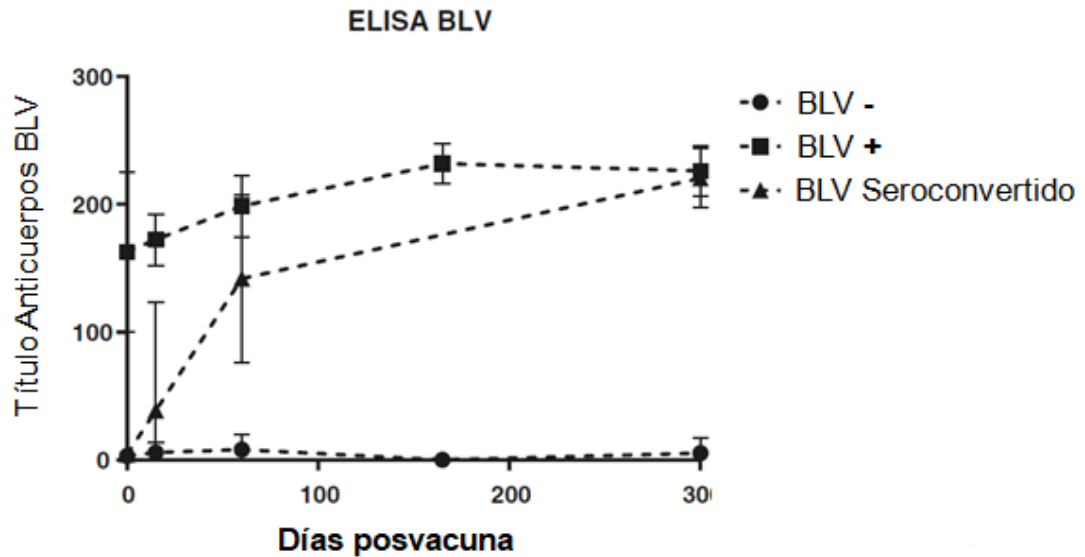


Figura 2. Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de Fiebre Aftosa. Para cada media se muestra el error estándar (SEM). El grupo BLV - (n=10) y BLV + (n=20) permanecieron negativos y positivos durante todo el ensayo, mientras que el grupo “BLV Seroconvertido” (n=5) fueron negativos al día 0, pero luego seroconvirtieron.

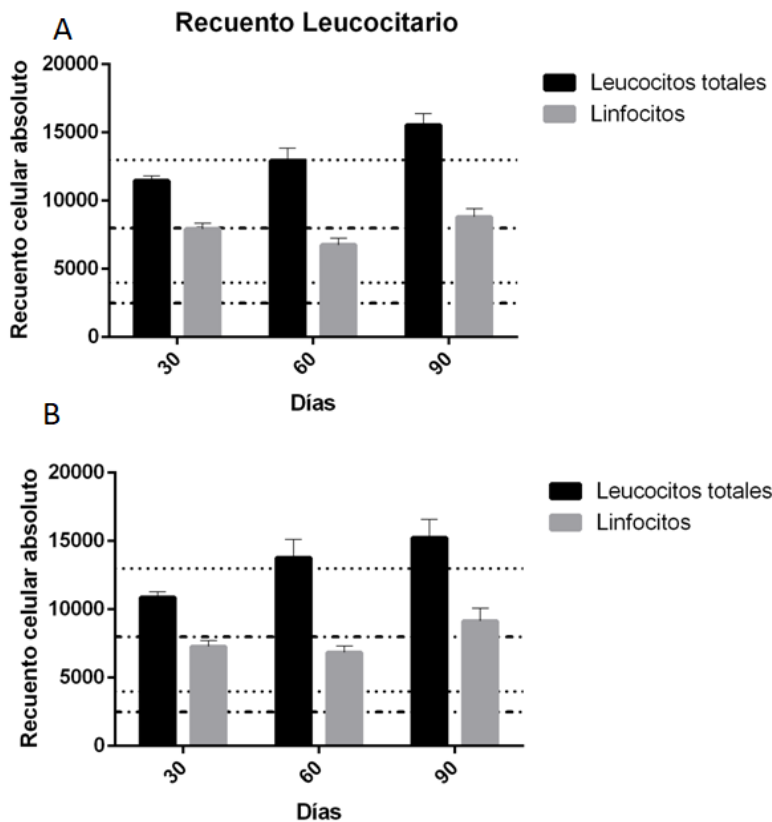


Figura 3. Recuento leucocitario. A) Ensayo de clostridios B) Ensayo de Fiebre Aftosa. Línea punteada gris rango de leucocitos totales en bovinos y línea punteada negra rango esperado de linfocitos en bovinos.

6.2 Carga proviral del BLV en vaquillonas Holando

La media de carga proviral al inicio del estudio fue de 6200,9 copias/ μ g ADN (SEM 1963 copias/ μ g ADN) y al final del estudio, luego de 12 meses, fue de 12383,6 copias/ μ g ADN (SEM 3894 copias/ μ g ADN), siendo esta diferencia significativa ($p=0.004$). Se determinó animales de alta carga proviral aquellos con más de 2000 copias/ μ g ADN (INTA-Castelar, Gutierrez y col., 2011).

A lo largo del estudio se observó tres comportamientos con respecto a la carga proviral de animales infectados naturalmente; animales que se mantuvieron durante todo el estudio con alta carga (8/20), animales de baja carga durante todo el estudio (8/20), animales que su carga proviral se transformó de baja a alta carga (3/20) y un animal que no se pudo determinar su carga al final del estudio pero que había iniciado el mismo con alta carga.

Cuadro II. Determinación de la carga proviral mediante *Real time* PCR de vaquillonas Holando en un año.

BLV_ELISA	Productor	ID	qPCR_gen <i>pol</i>	qPCR_gen <i>pol</i>	DELTA a los	
			inicial	final	12 meses	Categoría
Positiva	EG	3512	10086,8	0	-10086,8	alta-?
Positiva	EG	3513	28739,4	33731,2	4991,8	alta-alta
Positiva	Jl	3521	149,1	320,6	171,5	baja-baja
Positiva	Jl	3522	16303,5	20515,9	4212,4	alta-alta
Positiva	Jl	3524	122,8	783,02	660,2	baja-baja
Positiva	Jl	3526	6592,2	5820,9	-771,3	alta-alta
Positiva	Jl	3527	< 5	1160,3	1160,3	baja-baja
Positiva	IP	3530	10033,6	5330,8	-4702,8	alta-alta
Positiva	IP	3531	22470	22086,4	-383,6	alta-alta
Positiva	IP	3532	<5	<5	0	baja-baja
Positiva	IP	3542	9321,2	51936,7	42615,5	alta-alta
Positiva	PA	3556	<5	<5	0	baja-baja
Positiva	PA	3561	1777,7	49688,4	47910,7	baja-alta
Positiva	PA	3563	<5	<5	0	baja-baja
Positiva	NB	3571	10004,5	18770,3	8765,8	alta-alta
Positiva	NR	3600	7686,7	3536	-4150,7	alta-alta
Positiva	NR	3603	483,9	7527,5	7043,7	baja-alta
Positiva	QN	3631	100,3	26208,1	26107,8	baja-alta
Positiva	RD	3655	121	236,4	115,4	baja-baja
Positiva	BID	4402	< 5	< 5	0	baja-baja

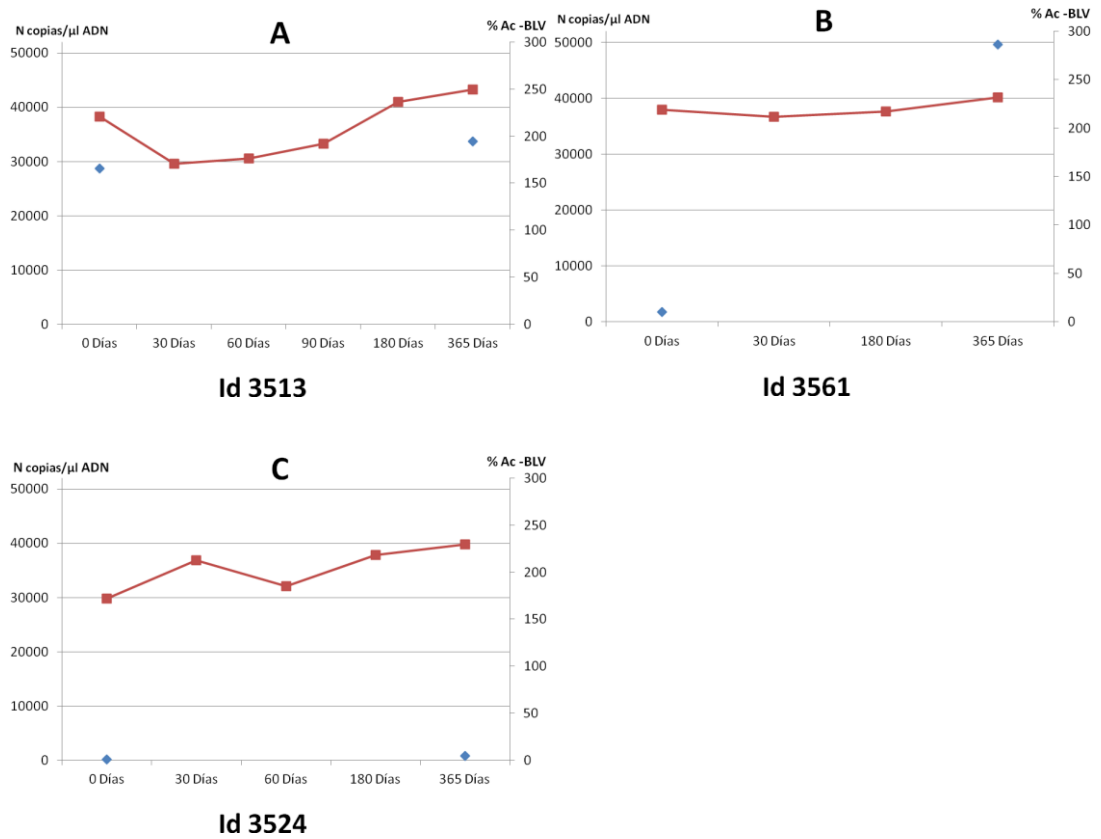


Figura 4. Carga proviral y título de anticuerpos anti BLV de vaquillonas Holando durante 1 año. Rojo: % anticuerpos anti-BLV, Azul: carga proviral (N de copias/ μ g ADN) A) Vaquillona Id 3513, B) Vaquillona Id 3561, C) Vaquillona Id 3524. Tres ejemplos del comportamiento distintos detectados en el ensayo.

6.3 Análisis filogenético

Se desprende del árbol filogenético que todas las secuencias analizadas en este estudio corresponden al genotipo 1 del virus de la Leucemia Bovina. De estas, 16 secuencias corresponden a 8 animales al inicio y final de estudio y 2 animales solo al inicio y 1 animal al final del estudio.

Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-1268,45). El porcentaje en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas del árbol (Figura 6). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos *Neighbor-Join* y *BioNJ* a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior. El árbol está dibujado a escala. Se observan en el nodo de cada rama las probabilidades, siendo en este caso una probabilidad del 84% la agrupación con cepas de Argentina, Paraguay e inclusive Japón, observándose una circulación del virus.

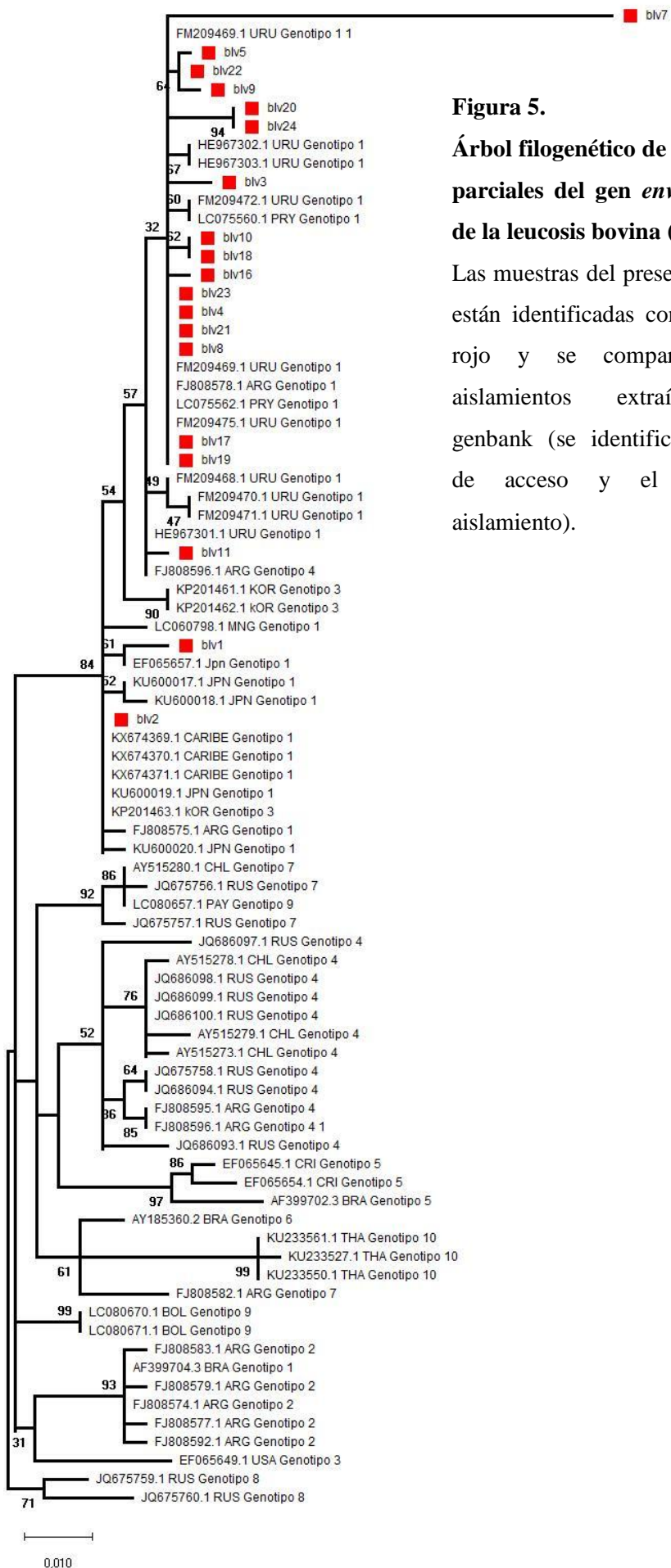


Figura 5.
Árbol filogenético de secuencias parciales del gen *env* del virus de la leucosis bovina (BLV).
 Las muestras del presente estudio están identificadas con cuadrado rojo y se compararon con aislamientos extraídos del genbank (se identifica números de acceso y el país de aislamiento).

6.4 Anticuerpos totales anti-toxinas alfa, beta y épsilon del *Clostridium perfringens*

6.4.1 Respuesta de los animales a la vacunación

Luego de la primoinmunización con la vacuna polivalente comercial, se evidenció un aumento claro en el título de anticuerpos a los 30 dpv únicamente contra la toxina épsilon. Para las demás toxinas (alfa y beta), el efecto de la primoinmunización a los 30 dpv, no fue significativo según los resultados obtenidos por ELISA. Sin embargo, luego de la revacunación (día 60), se encontró un aumento significativo de los anticuerpos contra las tres toxinas analizadas con niveles de positividad entre + y +++ para las toxinas alfa, beta y épsilon. Luego de ese periodo, la cinética en los títulos de anticuerpos contra las tres toxinas, tuvieron un comportamiento diferente en cada grupo (toxinas alfa, beta y épsilon). En el caso de los anticuerpos contra la toxina alfa, los títulos continuaron aumentando hasta el día 365. Para el caso de la toxina beta, los títulos cayeron hacia el día 90 y se mantuvieron bajos en niveles 0 de positividad hasta el final del experimento. Finalmente para la toxina épsilon, luego de disminuir hacia el día 90, se evidenció un aumento en los títulos de anticuerpos al día 180, que luego disminuyeron hacia el final del experimento (Figura 2).

6.4.2 Respuesta a los diferentes antígenos según estatus a BLV

El porcentaje de inhibición de anticuerpos generado luego de las inmunizaciones contra *Clostridium perfringens* en bovinos infectados naturalmente con BLV no difirió significativamente del porcentaje de inhibición de anticuerpos de bovinos seronegativos para las tres toxinas en todo el estudio ($p > 0.05$) (Figura 6).

Al inicio del experimento (día 0), tanto los animales seronegativos como los infectados con BLV presentaron niveles bajos de anticuerpos contra las tres toxinas del *Clostridium perfringens* (alfa, beta y épsilon) que se interpretaron como “niveles 0” de positividad según el kit de ELISA utilizado (*Bio-x Diagnostics - Belgium*).

Se observó diferente cinética en la curva de anticuerpos entre las tres toxinas analizadas, pero entre grupos (BLV+ y BLV-) fue similar para los tres casos (Figura. 6a, b, c), al igual que la duración de la inmunidad, que no difirió según el status para BLV. Para la toxina épsilon se observó un descenso del título de anticuerpos aproximadamente a los 90 días, mostrando posteriormente un leve aumento de

anticuerpos luego que los animales fueron revacunados a los 150 días (Figura. 6c). En el grupo BLV – el título de anticuerpos contra esta toxina fue mayor (nivel de positividad ++) que el grupo BLV + (nivel de positividad +). Sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). No se observó dicho comportamiento para la toxina alfa, en la cual el título de anticuerpos aumentó a lo largo de todo el estudio (Figura.6a).

En cuanto a la respuesta inmune contra la toxina beta del *Cl. perfringens*, en el total de los animales (BLV+ y BLV -), se observó una menor respuesta comparada con los resultados de las toxina épsilon y alfa, teniendo la toxina beta el porcentaje de inhibición por debajo del 20 % correspondiente a un grado de positividad de 0 (Figura. 6b), y por lo tanto no respondiendo a la revacunación. Para la toxina beta, el grupo BLV – obtuvo un nivel de positividad +, mientras que el grupo BLV + se mantuvo en el nivel de positividad 0, según el fabricante del kit.

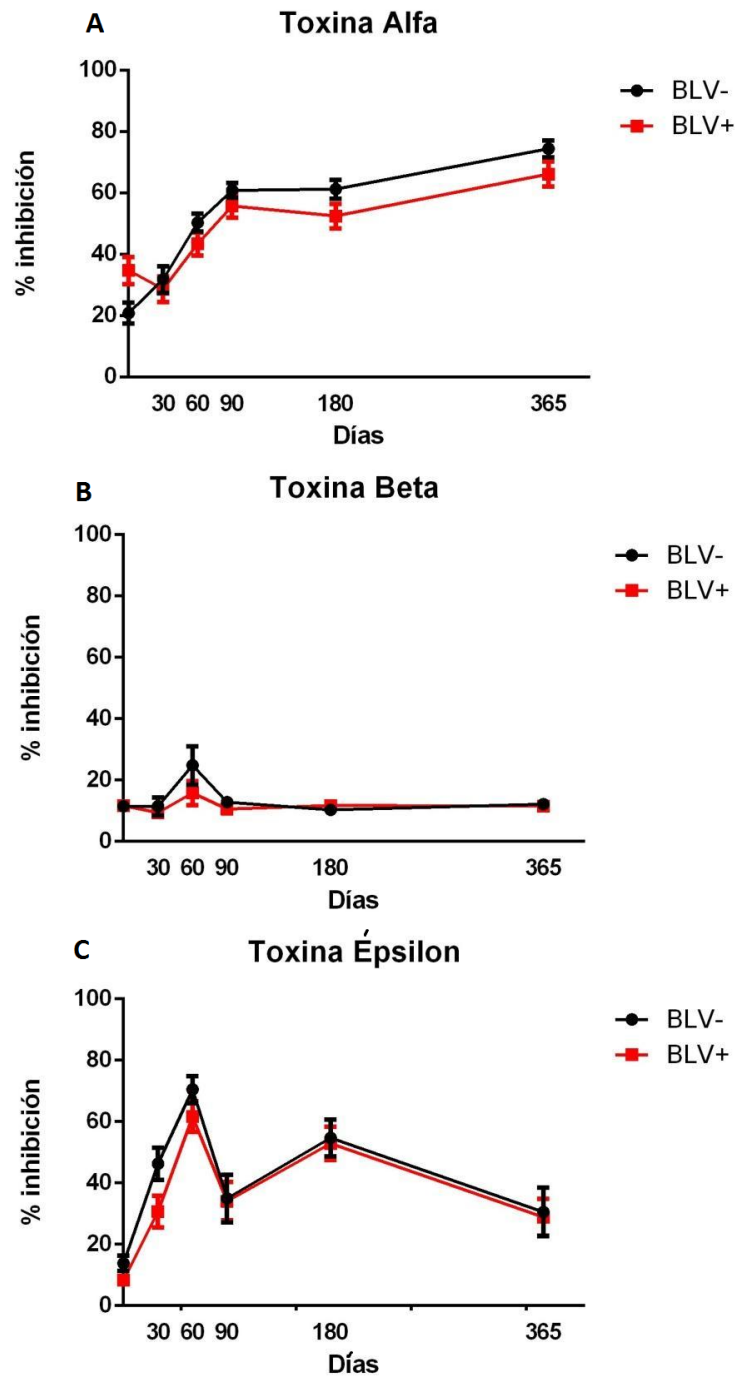


Figura 6. Porcentaje de Inhibición de los anticuerpos anti *Clostridium perfringens*, determinado por ELISA de bloqueo. 6a. Anticuerpos contra toxina Alfa del *Clostridium perfringens*. 6b. Anticuerpos contra Toxina Beta del *Clostridium perfringens*. 6c. Anticuerpos contra Toxina Épsilon del *Clostridium perfringens*. Circulo negro grupo seronegativo, cuadrado rojo animales seropositivos. No hubo diferencias significativas entre grupos seronegativo y seropositivos al virus de la Leucemia bovina (BLV) $p > 0.05$.

6.5 Anticuerpos neutralizantes anti-toxina épsilon del *Clostridium perfringens*

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

6.6 Comparación de técnicas para la detección de anticuerpos anti-toxina épsilon del *Clostridium perfringens*

Se realizó un análisis de concordancia entre las técnicas ELISA y seroneutralización *in vitro*. La asociación entre las técnicas fue baja con un coeficiente Kappa 0.176 (0.084-0.268). Considerando a la seroneutralización como técnica patrón, el kit de ELISA utilizado tiene una sensibilidad de 90.6 % y una especificidad de 44.8%.

6.7 Anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa

La cinética de las curvas de anticuerpos analizados por ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE) fueron similares entre los tres grupos de ensayo hasta el día 300. Los títulos de anticuerpos totales aumentaron después de la vacunación en todos los animales y esta diferencia fue significativa a los 15 días post vacunación (dpv) para cada grupo en comparación con los títulos medidos a día 0 ($p < 0,01$). Luego de ese período, los títulos de anticuerpos disminuyeron y permanecieron en niveles bajos hasta el final del experimento, manteniéndose por debajo del 75% del PPE después de los 60 dpv (Figura 7a). Los títulos de anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa por LPBE a los 15 dpv no difirieron estadísticamente entre los grupos, aunque fueron mayores en el grupo BLV- en comparación con el grupo BLV + (Fig. 7a).

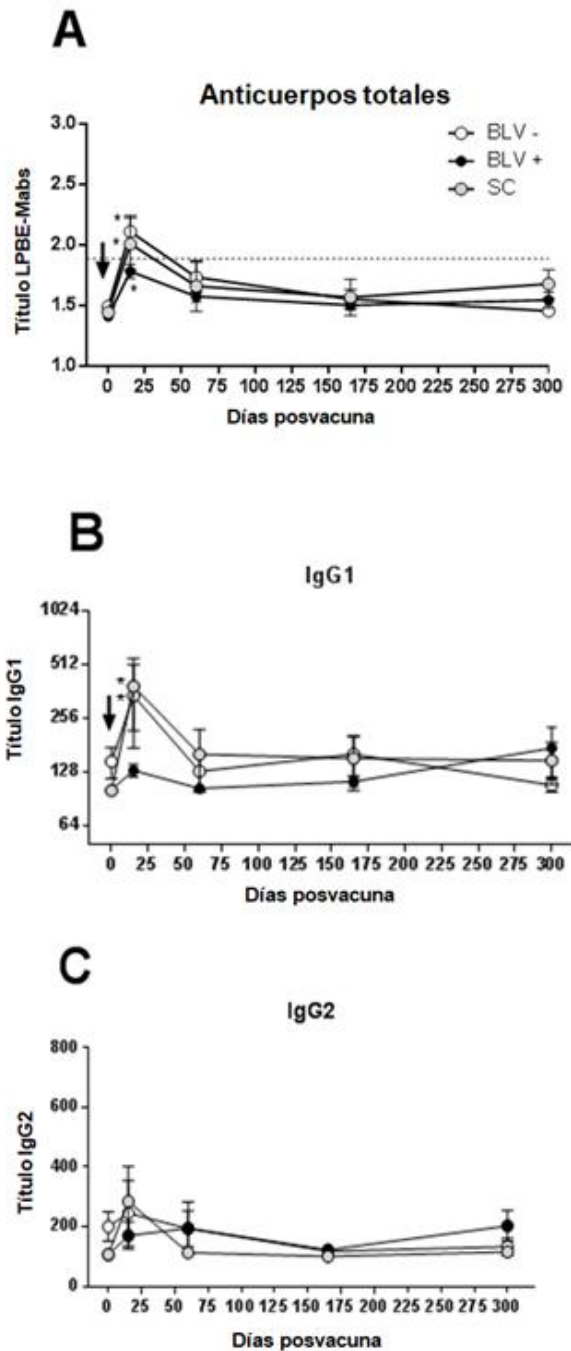


Figura 7. Cinética de los títulos de anticuerpos contra la cepa A/24 Cruzeiro del virus de la Fiebre Aftosa. En el grupo BLV negativo (BLV -; n= 10; círculos blancos), BLV positivo (BLV +; n= 20; círculos negros) y grupo seroconvertido (SC; n= 5; círculos gris). Para cada media se muestra el error estándar (SEM). A) Títulos medidos por ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE). Título de 1.90 (línea punteada) está relacionada a protección contra A24/Cruzeiro (EPP 75%). B) IgG1 y C) IgG2 fueron determinados mediante ELISA indirecto. Todos los animales recibieron una sola dosis comercial de vacuna bivalente contra Fiebre Aftosa al 0 días posvacunación (dpv). Los títulos fueron significativamente mayor en todos los grupos al 15 dpv comparados con el 0 dpv del mismo

grupo ($p < 0.01$).

Por otro lado, el índice de avidéz de los anticuerpos totales fue analizado al 15 dpv. Si bien hubo una tendencia aparente de una mayor avidéz en los anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa en el grupo BLV –, estas diferencias no fueron significativas (Figura 8e).

6.8 Isotipos de anticuerpos específicos contra el virus de la Fiebre Aftosa

Se encontró un aumento importante en los títulos de IgM a los 15 dpv en todos los grupos de ensayo y esa diferencia fue significativamente mayor en los animales BLV – cuando comparamos con los BLV+ ($p < 0,01$). Por otro lado, también se encontró una diferencia significativa en los títulos de IgG1 a los 15 dpv, con una media del título de 287,1 y 127,8 en los grupos BLV – y BLV+ respectivamente (Figura. 7b y 8b). Luego de ese periodo, y en el tiempo que duró el ensayo, no se encontraron diferencias importantes para este isotipo entre los grupos. En lo que refiere a la producción de IgG2, los niveles no variaron significativamente entre los grupos a lo largo del experimento, a pesar de encontrarse una mayor respuesta en los animales BLV – a los 15 dpv, con un título medio de 229.3 comparado con 174.6 en el grupo BLV + (Figura. 7c y 8d).

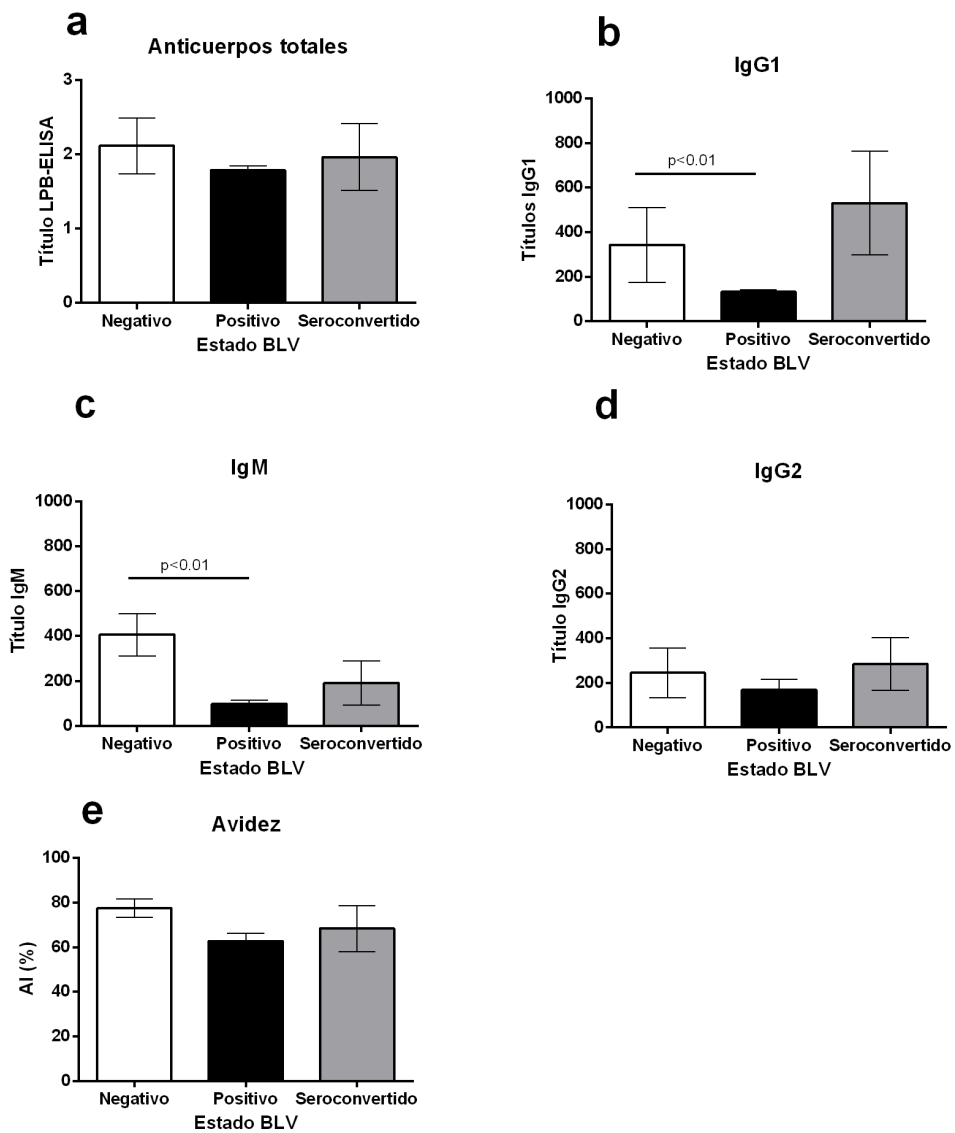


Figura 8. Comparación 15 días posvacunación (dpv) de anticuerpos totales por LPBE (a), IgG1 (b), IgM (c), IgG2 (d) e índice de avidéz (IA) (e) contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa. En el grupo BLV negativo (BLV -; n= 10; barras blancos), BLV positivo (BLV +; n= 20; barras negros) y grupo seroconvertido (SC; n= 5; barras gris). Para cada media se muestra el error estándar (SEM). Todos los animales recibieron una sola dosis comercial de vacuna bivalente contra Fiebre Aftosa al 0 dpv. Los títulos de IgM e IgG1 fueron significativamente mayores en BLV - comparados BLV + ($p < 0.01$).

7. DISCUSIÓN

Uruguay presenta altas prevalencias del virus de la Leucemia Bovina, siendo este el principal patógeno viral de importancia para el rodeo lechero de todo el mundo. Es reconocido en nuestro país por las restricciones en la exportación de vaquillonas en pie, siendo esta una barrera en el comercio internacional. Sin embargo, también se sabe que la infección causa pérdidas productivas directa e indirectamente, como por ejemplo una disminución en la producción láctea (Bartlett y col., 2014), un desbalance a nivel de la respuesta inmune (Kabeya y col., 2001; Erskine y col., 2011), así como posiblemente impacto también en la performance reproductiva (VanLeeuwen y col., 2010). Fue objetivo de esta tesis por lo tanto, aportar información sobre la infección subclínica y el efecto en la repuesta inmune, así como la variación de la carga proviral a lo largo del tiempo y la detección de los genotipos virales circulantes en el rodeo.

Con relación a la carga proviral de BLV, se observó un aumento de la misma luego de 12 meses de experimento. La categoría en estudio eran vaquillonas Holando de un campo de Recría en el cuál en ensayos previos a esta tesis y en este mismo establecimiento, se determinó una tasa de transmisión del 39% (Puentes y col., 2016a). Otros autores han observado que no hay diferencias en la carga proviral cuando comparan vaquillonas y ganado adulto, y que 9.8% de las vaquillonas previo al primer parto presentan alta carga proviral (Merlini y col., 2016). En la presente tesis luego de 12 meses, 11/20 (55%) terneras de aproximadamente 20 meses, finalizaron el ensayo con alta carga proviral. La infección por BLV ocurre generalmente durante los primeros dos años de vida, donde aun los animales jóvenes no han mantenido contacto con el ganado adulto (Merlini y col., 2016), por lo que toda estrategia de control de la enfermedad debería de consistir en tomar medidas tan pronto como sea posible. Se propone como estrategia de control, separar los animales acorde a su carga proviral en sangre periférica ya que existen dos perfiles de infección. Los animales de alta carga proviral y los de baja carga proviral (Juliarena y col., 2007; Juliarena y col., 2016), teniendo estos últimos un bajo número de linfocitos infectados en sangre periférica (Burny y col., 1987). Una consideración importante sobre este hecho es que el ganado infectado con altas cargas virales o LP son considerados una importante fuente de infección dentro del rodeo (Mekata y col., 2015). Con lo que respecta al título de anticuerpos anti-BLV y

la carga proviral, Gutiérrez y col., (2012) reportan que la respuesta humoral refleja la carga proviral ya que encontraron una correlación positiva entre la carga proviral y el título de anticuerpos anti-p24. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos animales con altos título de anticuerpos que presentaron baja carga proviral, creando la interrogante si realmente medir el título de anticuerpos es una estrategia epidemiológica para el control de la enfermedad. Las diferencias encontradas pueden deberse al antígeno utilizado en el ELISA para medir la respuesta humoral, siendo en nuestro trabajo anticuerpos totales dirigidos a la gp51, mientras que en Gutiérrez y col. (2012) eran anticuerpos anti-p24 los que presentaron correlación positiva con los niveles de carga proviral.

Otro aspecto estudiado en esta tesis, fue los genotipos circulantes en el rodeo. En este sentido, la variabilidad genética de los virus puede proporcionar una ventaja selectiva en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Todas las secuencias analizadas en este estudio (n=19) fueron del genotipo 1 al igual que lo encontrado por Moratorio y col. (2010) hace ya algunos años. No se encontró variaciones en un mismo animal a lo largo del tiempo, demostrándose ser secuencias conservadas del gen *env* de la glicoproteína gp51. El genotipo 1 es el más prevalente en la región y tiene mayor distribución alrededor del mundo (Benavides y col., 2017). De los análisis filogenéticos, ya sea basados en la región parcial como gen completo del *env-gp51*, se desprenden que existen al menos 10 genotipos de BLV (Lee y col., 2016). Sin embargo, en este ensayo se detectó únicamente un genotipo en las muestras de vaquillonas holando analizadas, aún proviniendo de diferentes productores de la zona lechera sur del Uruguay. Por lo tanto, se podría inferir que este parece ser el genotipo de BLV predominante en los rodeos de esta cuenca lechera. En base a estos resultados, no se pudo asociar si la variabilidad genética influye en la respuesta inmune de los animales y en la carga proviral de los mismos. Se ha asumido generalmente que BLV exhibe una alta estabilidad genética que puede explicarse por el hecho de que el virus replica su ADN proviral principalmente por división mitótica de células B infectadas, con una menor participación de la transcripción inversa. Sin embargo, ya hay reportados al menos 10 genotipos diferentes del virus de la Leucemia bovina en el mundo (Moratorio y col., 2010; Polat y col., 2017), lo que demostraría que existe un comportamiento mutagénico característico de virus ARN en BLV.

Prevenir las infecciones en los rodeos es un componente crítico en la producción bovina y mantenimiento del bienestar animal. Son las vacunas sumamente importantes para proteger la salud del rodeo (Frie y col., 2016). El ganado de leche recibe vacunas contra diversos patógenos entre ellos virus de la diarrea viral bovina, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de la fiebre aftosa, *Brucella abortus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus anthracis*. Muchos de estos patógenos pueden causar efectos devastadores, incluida la pérdida severa de producción de leche, aborto e incluso la muerte.

En esta tesis se analizó cuantitativamente la respuesta humoral contra las toxinas alfa, beta y épsilon de *Clostridium perfringens* y contra Fiebre Aftosa en animales vacunados a campo con un plan de inmunización aplicado en Uruguay, en un rodeo de cría típica de nuestro país. La elección de los patógenos y sus toxinas en el caso del Clostridios se basan en la importancia del mismo para la producción nacional y la disponibilidad de herramientas para su determinación y el virus de la Fiebre Aftosa por su importancia económica y comercial.

En cuanto al ensayo de Clostridios y BLV, no se encontraron diferencias en la respuesta inmune de anticuerpos totales inducida por la vacuna contra *Clostridium perfringens* entre animales seropositivos y seronegativos a BLV a nivel de campo. Trabajos reportado por Erskine y col. (2011) encontraron que la inmunización con una vacuna comercial conteniendo *Escherichia coli*, produjo un título significativamente menor de IgG2 en animales infectados con BLV. Otros autores como Frie y col., 2016, encontraron menor título de IgM e IgG1 en bovinos BLV positivos cuando fueron inmunizados a campo con una vacuna reproductiva contra *Leptospira spp.* y para herpesvirus bovino tipo 1, donde también se detectó un menor título de IgG2. Estos antecedentes pueden explicar el hecho de que durante el ensayo de Clostridios no se hayan encontrado diferencias significativas, habiendo analizado anticuerpos totales contra las toxinas clostridiales y no discriminada por isotipos (IgM, IgG1 o IgG2) como lo hicieron los trabajos citados anteriormente. Se ha demostrado desde hace mucho tiempo que IgG1 e IgG2 bovinas promueven la opsonización y fagocitosis por macrófagos, y que solo IgG2 promueve la opsonización vía neutrófilos *in vitro* (Howard, 1984). También los isotipos IgM, IgG1 e IgG2 están asociados a funciones neutralizantes dependiendo del agente infeccioso (Lin y col., 2001; Pega y col., 2013). En este mismo sentido, las variaciones encontradas en estos datos pueden deberse a la diferente naturaleza del

agente causal en los estudios mencionados: virus ARNss desnudo, virus ADNds envueltos, y bacterias gram negativas y antígenos purificados. En este caso, el patógeno es una bacteria gram positiva y que induce la inmunidad fundamentalmente por medio de exotoxinas. Por lo tanto se podría esperar que las respuestas inmunes protectoras inducidas en cada caso sean diferentes en cuanto a isotipos de inmunoglobulinas. Bajo las condiciones de este estudio y con las técnicas diagnósticas disponibles, no se pudo demostrar que las vaquillonas infectadas con BLV presentaran una respuesta inmune diferente al rodeo de animales no infectados después de recibir un plan de vacunación contra las toxinas del *Clostridium perfringens*. En futuros ensayos se deberán evaluar discriminadamente los isotipos de inmunoglobulinas u otros componentes del sistema inmune, para determinar si existen diferencias a otro nivel que no fueron detectadas en la presente investigación.

Por otra parte, en cuanto a la duración de la inmunidad contra clostridios a lo largo del estudio de manera global, si bien la curva de respuesta fue diferente para las tres toxinas, los resultados evidenciaron una baja respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon utilizando la técnica de referencia disponible. En ese sentido, la respuesta de anticuerpos totales utilizando ELISAs comerciales fue variable según la toxina y no se correlacionó con la seroneutralización *in vitro*. De acuerdo a los resultados encontrados utilizando la técnica de SN *in vitro*, siendo esta la técnica de referencia (Salvarani y col., 2010; Souza y col., 2010; Salvarani y col., 2013), todos los animales del estudio presentaron un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes para la toxina épsilon luego de los 60 días post inmunización. Otros trabajos realizados en Uruguay, han encontrado disminución de los anticuerpos anti *C. chauvoei* luego de los 90 dpv en bovinos medidos por ELISA (Rivera, 2014), así como un marcado descenso de los anticuerpos 90 dpv para nueve especies de clostridios diferentes luego de la inmunización de corderos (Rossi y col., 2018). Por otro lado, y contradictorio a las demás toxinas, la respuesta de anticuerpos totales contra la toxina alfa fue aumentando a lo largo del presente estudio. Es importante destacar que la mayoría de las vacunas contra clostridios recomiendan su revacunación anual, demostrando con este estudio fluctuaciones en la respuesta de anticuerpos a lo largo de 1 año de estudio.

Referente a las técnicas utilizadas para la determinación de la respuesta de anticuerpos anti-clostridios que incluyó tres kits de ELISA de bloqueo comerciales, algunos autores manifiestan la viabilidad de utilizar la técnica de ELISA para evaluar la respuesta serológica contra clostridios como alternativa a los ensayos biológicos (Krt, 1999). Sin embargo, no existen suficientes evidencias que asocien los títulos de anticuerpos mediante ELISA y la protección *in vivo* contra la enfermedad. Un estudio de Goossens y col. (2016) encontraron altos títulos de anticuerpos anti-toxina *alfa* del *Cl. perfringens*, seis semanas luego de la vacunación mediante ELISA (*Bio-X Diagnostics*) y los mismos inhibieron la actividad de la toxina *alfa in vitro*. Sin embargo y a pesar de eso, no confirieron protección a la necrosis en el desafío a nivel intestinal en terneros. Existiendo por lo tanto una discrepancia entre los títulos de anticuerpos anti toxina *alfa* cuantificados por ELISA y la capacidad protectora de estos anticuerpos en el modelo de necrosis intestinal. Otro estudio evidenció una muy buena correlación (0.5-0.8) entre un ensayo de ELISA desarrollado para detectar anticuerpos anti toxinas del *Cl. perfringens* y la seroneutralización *in vitro* (Borrmann y col., 2006). Tanto los resultados de ELISA como los de SN *in vitro* encontrados en el presente estudio, muestran bajos títulos de anticuerpos y un índice de asociación entre técnicas bajo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este ensayo deben ser profundizados y comparados con pruebas de desafío a campo. Así mismo, se deben demostrar la utilidad de los kits de ELISA empleados, ya que son herramientas disponibles de aplicación veterinaria.

Cuando se evaluó la inmunidad contra Fiebre Aftosa en vaquillonas infectadas con BLV, los resultados arrojaron algunos datos interesantes publicados en Puentes y col. (2016b). Es importante señalar que Fiebre Aftosa es una enfermedad bajo campaña oficial en el Uruguay, y por lo tanto el protocolo de inmunización que se utilizó fue el establecido por la reglamentación vigente. Esto quiere decir que se utilizó una única dosis de vacuna bivalente comercial durante el período reglamentario. Los principales resultados de este experimento demostraron que cuando las vaquillonas estaban infectadas con BLV, produjeron menor cantidad de IgM e IgG1 a los 15 dpv que los animales seronegativos. Esto es relevante si tenemos en cuenta que IgG1 está relacionada con la protección contra Fiebre Aftosa en animales vacunados (Capozzo y col., 1997; Pega y col., 2015) mientras que IgM es importante durante la primoinfección en animales inmunológicamente vírgenes

(Pega y col., 2013). La explicación de estas diferencias podría estar dada por la inmunomodulación de la respuesta de las células TCD4 que induce BLV en los animales infectados, modificando el perfil de la respuesta inmune Th1/Th2 a medida que progresa la infección, aumentando así, citoquinas inmunoregulatoras (Kabeya y col., 2001). La expresión de IgG1 está positivamente regulada por IL-4 y la de IgG2 por la expresión de IFN- γ (Estes & Brown, 2002), lo que podría relacionarse con esta diferencia de isotipos encontrada contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa en animales libres e infectados con BLV. La importancia práctica en este caso, podría estar asociada a las funciones biológicas de las inmunoglobulinas. Cada subclase dentro de un mismo isotipo difiere en algunos aminoácidos, lo que modifica las propiedades físicas de la molécula así como la movilidad de la misma, pudiendo determinar diferencias a nivel de la actividad biológica. IgG1 constituye cerca del 50% de las IgG en el suero de los bovinos y, a diferencia de otras especies, en rumiantes (especialmente bovinos) IgG1 es la mayor inmunoglobulina secretoria en calostro y leche (Estes & Brown, 2002). Ensayos a campo han demostrado la importancia de esta subclase de inmunoglobulina para la protección contra Fiebre Aftosa en bovinos, encontrándose que animales con un marcado aumento de IgG1 en sangre luego de una inmunización con la cepa A24/Cruzeiro inactivada, usualmente no presentan signos clínicos luego del desafío (Mulcahy y col., 1990). En cuanto al índice de avidez, donde existió una tendencia en los animales seronegativos a BLV a presentar mayor índice, se puede sugerir que todos los grupos presentaban una respuesta protectora, ya que el título de anticuerpos logrados eran de calidad.

En referencia a la respuesta a la vacuna de la Fiebre aftosa en forma global, la respuesta inmune a la vacunación contra este virus es actualmente evaluada utilizando ELISA de bloqueo de fase líquida (LPBE) y existen curvas publicadas que relacionan los títulos de LPBE con la protección. Se ha estimado que un porcentaje esperado de protección (EPP) del 75% corresponde a títulos LPBE equivalentes a 1,90 para la cepa A24/Cruzeiro (Maradei y col., 2008; Rabiolo y col., 2010). Los animales incluidos en este estudio presentaron bajos niveles de títulos de anticuerpos entre 1,4 y 1,5 para A24/Cruzeiro en el día 0 del ensayo. Esta respuesta basal podría estar asociada a anticuerpos maternos transferidos por el calostro ya que los animales utilizados fueron animales jóvenes a partir de los 6 meses de edad. Esta respuesta no estaría interfiriendo con la vacuna oleosa aplicada en este ensayo (Patil y col., 2014). A los 15 días pos vacunación todos los animales respondieron con un

título promedio de 1,76 y 2,12 en BLV + y BLV-, respectivamente. Aunque se observó una mayor respuesta en los animales no infectados con títulos superiores a 1,90 (EPP de 75%), esta diferencia no fue significativa entre grupos ($p > 0.05$). Después de este período, se observó una fuerte disminución en los títulos de anticuerpos en todos los grupos luego del día 60, hasta niveles por debajo del 75% de EPP y luego permaneció bajo hasta el final del experimento (Figura 7). En función de estos resultados e independientemente del estado de BLV de las vaquillonas, la dosis única de vacunación aplicada en este experimento no fue suficiente para mantener a los animales con niveles aceptables de títulos de anticuerpos protectores contra Cepa A24/Cruzeiro del VFA. Es importante destacar que se utilizó una vacuna comercial aprobada por las autoridades sanitarias de nuestro país y fue aplicada de acuerdo con las recomendaciones de la misma.

8. CONCLUSIONES

Este es el primer ensayo a campo en Uruguay que evalúa la respuesta humoral contra toxinas clostridiales y para el virus de Fiebre Aftosa en bovinos y además lo relaciona con la infección subclínica con el virus de la Leucemia bovina, evaluándose además la carga viral para este virus.

Podemos concluir la presencia del genotipo 1 en el rodeo holando de recría estudiado, siendo el único genotipo identificado hasta el momento en el país. Además se observó que la carga proviral de BLV en animales infectados puede variar a lo largo del tiempo.

Se desprende de este estudio que al inmunizar contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis bovinos infectados con BLV, estos presentan una respuesta significativamente menor en los títulos de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa, en las condiciones a campo de un establecimiento de recría de bovinos de leche del Uruguay.

Estos resultados son un aporte original al conocimiento sobre la infección con BLV en la producción bovina no solo para Uruguay, ya que apoyan la hipótesis de que las vacas BLV positivas no responden a la vacunación de igual manera que las vacas BLV negativas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aida Y, Miyasaka M, Okada K, Onuma M, Kogure S, Suzuki M, Minoprio P, Levy D, Ikawa Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *Am J Vet Res* 50:1946-1951.
2. Álvarez N, Oriani DS. (2000). Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) como herramienta diagnóstica de leucosis enzoótica bovina. Argentina: Universidad Nacional de La Pampa, Facultad de Ciencias Veterinarias.
3. Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT, Erskine RJ. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 96(3):1591-7.
4. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, Zalucha J, Erskine RJ. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 244(8):914-22.
5. Bartenschlager R, Lohmann V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin.Gastroenterol.* 14:241-254.
6. Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 2a ed. Paris, OIE, p. 723-738.
7. Benavides B, Muñoz S, Ceriani C. (2017). Molecular analysis of a fragment of bovine leukemia virus env gene by Nested-PCR in dairy cows from Pasto, Nariño. *Med Vet* 33:67-75.
8. Bendixen HJ. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: Leukosis Enzootica bovis. *Ann N Y Acad Sci* 108:1241-1267.
9. Brasseur R., Cornet B, Burny A, Vandenbranden M, Ruyschaert JM. (1988). Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res Hum Retroviruses* 4:83-90.
10. Borrmann E, Schulze F, Cussler K, Hanel I, Diller R. (2006). Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novy* toxin. *Vet Microb* 114:41-50.
11. Bucafusco D, Di Giacomo S, Pega J, Juncos MS, Schammas JM, Perez-

- Filgueira M, Capozzo, A. (2014). Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*. 32(48):6576–6582.
12. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32:149-170.
 13. Capozzo AV, Periolo OH, Robiolo B, Seki C, La Torre JL, Grigera PR. (1997). Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine* 15(6-7):624-30.
 14. Chamizo EG. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *REDVET* 6(7):2-25. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf> Fecha de consulta: 17/08/18
 15. De Brun L, Algorta A, Alvarez J.P, Puentes R. (2013). Transmisión de la Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de cría de ganado lechero en el sur del Uruguay. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Paysandú, Uruguay. p 195-196
 16. De la Sota MD. (2004). Manual de procedimientos Leucosis Bovina Enzoótica, Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, SENASA, 34 p. Disponible en: http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/09%20Leucosis.pdf Fecha de consulta: 17/08/18.
 17. DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias (2017). Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estad%C3%ADstico-de-diea-2017>. Fecha de consulta:3/08/2018.
 18. Dube S, Abbott L, Dube D.K, Dolcini G, Gutierrez S, Ceriani C, Juliarena M, Ferrer J, Perzova R, Poiesz B.J. (2009). The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology* 6: 120.
 19. Eigen M, Gardiner W, Schuster P, Winkler-Oswatitsch R. (1981). The origin of genetic information. *Sci Am* 244: 88-92.

20. Emanuelson U, Scherlinga K, Pettersson H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med* 12: 121-131.
21. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. (2012) Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 95(2):727-34.
22. Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM, Sordillo LM. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int* 3:915747.
23. Estes M, Brown W. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 90(1):1-10.
24. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 43(10):621-30.
25. Ferrer JF. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv Vet Sci Comp Med* 24:1-68.
26. Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, Vandermeers F, Debacq C, Sanchez-Alcaraz MT, Schwartz-Cornil I, Kerkhofs P, Jean G, Thewis A, Hay J, Mortreux F, Wattel E, Reichert M, Burny A, Kettmann R, Bangham C, Willems L. (2007). Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci* 12:1520-1531.
27. Frie M, Coussens P. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 163:103-114.
28. Frie M, Sporer K, Wallace J, Maes R, Sordillo L, Bartlett P, Coussens P. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 182:125-135.
29. Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 191:29-37.
30. García F, Calderón A, Almansa J, Garzón C, Márquez D, Jiménez G, Jaramillo F. (2000). Efectos de la infección por el virus de la leucosis bovina

- sobre la producción y reproducción en un hato lechero. *Rev FMVZ* 47(2):39-44.
31. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4:18.
 32. Goossens E, Verherstraeten S, Valgaeren B.R, Pardon B, Timbermont L, Schauvliege S, Rodrigo-Mocholi D, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez P.R, Van Immerseel F. (2016) Toxin-neutralizing antibodies protect against Clostridium perfringens- induced necrosis in an intestinal loop model for bovine necrohemorrhagic enteritis. *BMC Vet Res* 12:101.
 33. Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 151:255–263.
 34. Gutiérrez G, Carignano H, Alvarez I, Martínez C, Porta N, Politzki R, Gammella M, Lomonaco M, Fondevila N, Poli M, Trono K. (2012). Bovine Leukemia Virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet Res* 8:187.
 35. Howard CJ, (1984) Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of Mycoplasma bovis by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 6:321–326.
 36. Hopkins SG, DiGiacomo RF. (1997). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:107–128.
 37. Huber NL, DiGiacomo RF, Evermann JF, Studer E. (1981). Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: cohort analysis of the prevalence of antibody-positive cows. *Am J Vet Res* 42:1474– 1476.
 38. Inoue E, Matsumura K, Maekawa K, Nagatsuka K, Nobuta M, Hirata M, Minagawa A, Osawa Y, Okazaki K. (2011). Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Arch Virol* 156(7):1137-1141.
 39. Juliarena M, Barrios C, Ceriani C, Esteban E. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci* 99:1-4

40. Juliarena M, Gutierrez E, Ceriani C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res* 68(11):1220-1225.
41. Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. (2001). Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci* 63:703–708.
42. Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus. En: Levy JA (Ed.). *The Retroviridae*. New York, Plenum Press, p 39-81.
43. Krt B. (1999). Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Clostridium perfringens* beta anti-toxins. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 24(3):293-7.
44. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549
45. Langston A, Ferdinand G.A, Ruppanner R, Theilen G.H, Drlica S, Behymer D. (1978). Comparison of production variables of bovine leukemia virus antibody-negative and antibody-positive cows in two California dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1093–1098.
46. Lavoria MA, Di-Giacomo S, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Perez-Filgueira DM, Capozzo AV. (2012). Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against foot-and-mouth disease virus in cattle. *Vaccine*. 30(48):6845–6850.
47. Lee E, Kim EJ, Ratthanophart J, Vitoonpong R, Kim BH, Cho IS, Song JY, Lee kk, Shin YK. (2016). Molecular epidemiological an serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infect Genet Evol* 41:245-254
48. Lin X, O'Reilly KL, Burrell ML, Storz J. (2001) Infectivity- neutralizing and hemagglutinin –inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:357-362.
49. Lüchter F. (2004). Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. *Enfermedades infecciosas de los Rumiantes*. Buenos Aires. F Lüchter, 269 p.

50. Luciw P, Leung N. (1994). Mechanisms of Retrovirus Replication. En: Levy JA. The Retroviridae. New York, Plenum Press, p 159-263.
51. Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res* 11:353-358.
52. Mamoun RZ, Morisson M, Rebeyrotte N, Busetta B, Couez D, Kettmann R, Hospital M, Guillemain B. (1990). Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* 64: 4180-4188.
53. Maradei E, La Torre J, Robiolo B, Esteves J, Seki C, Pedemonte A, Iglesias M, D'Aloia R, Mattion N. (2008). Updating of the correlation between Ip ELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphtovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*. 26(51):6577–6586.
54. Martín D, Arjona A, Viana M, Soto I, Barquero N, Gómez-Lucía E. (2000). Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzoótica. *Med Vet* 17:133-141.
55. Marshak RR. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J Natl Cancer Inst* 41:243-263.
56. Merlini R, Gutierrez G, Alvarez I, Jaworski JP. (2016). Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Arch Virol* 161(11): 3215-3217.
57. 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. *J Vet Med Sci* 77:1115–1120.
58. Moratorio G, Obal G, Dubra A, Correa A, Bianchi S, Buschiazzo A, Cristina J, Pritsch O. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol* 155(4):481-9.
59. Moreira G, Salvarani, F, Cunha C, Mendonça M, Moreira A, Gonçalves L, Pires P, Lobato F, Conceição F. (2016). Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. *Sci Rep* 6:22816.
60. Mulcahy G, Gale C, Robertson P, Iyisan S, DiMarchi RD, Doel TR. (1990).

- Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8(3):249-56.
61. Nagaoka Y, Kabeya H, Onuma M, Kasai N, Okada K, Aida Y. (1999). Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Res* 59:975-981.
 62. Norby B, Bartlett PC, Byrem TM, Erskine RJ. (2016). Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J Dairy Sci* 99(3):2043-2052.
 63. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. (2018). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2018. Capítulo 2.4.10./ 2.1.8. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>. Fecha de consulta: 5/11/2018.
 64. Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuchi O, Murata S, Ohashi K. (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet Rec* 173:527.
 65. Patil PK, Sajjanar CM, Natarajan C, Bayry J.(2014). Neutralizing antibody responses to foot-and-mouth disease quadrivalent (type O, A, C and Asia 1) vaccines in growing calves with pre-existing maternal antibodies. *Vet Microbiol.*169(3–4):233–5.
 66. Pega J, Bucafusco D, Di Giacomo S, Schammas JM, Malacari D, Capozzo AV, Arzt J, Pérez-Beascochea C, Maradei E, Rodríguez LL, Borca MV, Pérez-Filgueira M. (2013). Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. *J Virol* 87(5):2489-95.
 67. Pega J, Di Giacomo S, Bucafusco D, Schammas J, Malacari D, Barrionuevo F, Capozzo A, Rodríguez L, Borca M, Pérez-Filgueira M. (2015). Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection. *J Virol* 89(18):9581-90.
 68. Polat M, Takeshima S, Aida Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J* 14:209.

69. Polat M, Takeshima S, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, Arainga M, Murakami T, Matsumoto Y, de la Barra Diaz V, Panei CJ, Gonzalez T, Kanemaki M, Onuma M, Giovambattista G, 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.
70. Portetelle E, Mammerickx M, Burny A. (1989). Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp 51. *J Virol Meth* 23: 211–222.
71. Puentes R, De Brun L, Algorta A, Alvarez JP, Sacco G, Oliveira M, Llambí S. (2016a). Horizontal transmission dynamics of Bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected holstein heifers. *Sci Anim Health* 4(3):294-309.
72. Puentes R, De Brun L, Algorta A, Da Silva V, Mansilla F, Sacco G, Llambí S, Capozzo AV. (2016b). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res.* 12(1):119.
73. Pyeon D, O'Reilly KL, Splitter GA. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing on persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70: 5706-5710.
74. Ressang AA, Mastenbroek N, Quak J, Van Griensven L, Calaft J, Hilgers J, Hageman C, Souissi T, Swen S. (1974). Studies on bovine leukaemia 1. Establishment of type C virus producing cell lines. *Zentralbl. Veterinarmed.* 21: 602-617.
75. Rivera Patrón M. (2014). Caracterización de la respuesta inmune humoral anti *Clostridium chauvoei* en bovinos. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay, 29 p.
76. Robert C. E (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5):1792–1797.
77. Robiolo B, La Torre J, Duffy S, Leon E, Seki C, Torres A, Mattion N. (2010). Quantitative single serum-dilution liquid phase competitive blocking ELISA for the assessment of herd immunity and expected protection against foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. *J Virol Methods* 166:21–27.

78. Rodríguez S, Florins A, Gillet N, De Brogniez A, Sánchez-Alcara M, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210-1248.
79. Rola-Luszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuźmak J. (2013). Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods* 189(2):258-64.
80. Rossi A, Mónaco A, Guarnaschelli J, Silveira F, Iriarte A, Benecke A, Chabalgoity J. (2018). Temporal evolution of anti-Clostridium antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccines. *Vet Immunol Immunopathol* 202:46-51.
81. Salminen M. (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type I by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423–1425.
82. Salvarini F, Lobato Z, Assis R, Lima C, Silva R, Pires P, Lobato F. (2010). In vitro evaluation of Clostridium septicum alpha toxoid. *Arq Bras Med Vet Zootec* 62(4):778-783.
83. Salvarini F, Lobato Z, Pires P, Silva R, Alves G, Pereira P, Lobato F. (2013). In vitro potency test for evaluation of Clostridium perfringens type D epsilon toxoid. *Arq Inst Biol* 80(4):450-452.
84. Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H, Murakami K. (2014). Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch Virol*. 59(10):2693-7.
85. 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. *J Virol* 68:4589-4596.
86. Simpson K, Callan R, Van Metre D. (2018). Clostridial Abomasitis and Enteritis in Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Prac* 34: 155-184.
87. Souza F, Blagitz M, Latorre A, Sanchez E, Batista C, Weigel R, Renno F, Sucupira M, Della Libera A. (2012) Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *J Vet Med Sci* 74:221-225.
88. Souza M, Lobato Z, Pires P, Silva R, Salvarani F, Assis R, Lobato F. (2010)

- Standardization of the titration of the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D in cell line as an alternative to animal bioassay. *Ciência Rural* 40:600-603.
89. Trainin Z, Brenner J, Meiom R, Ungar-Waron H. (1996) Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 54:293–302.
 90. Trotta M, Lahore J, Cardoso N, Osvaldo M, Catena Pérez-Filgueira M, Fernández F, Capozzo AV. (2015). Inmunización simultánea en ganado bovino contra fiebre aftosa y vacuna viva de anthrax no interfiere en la respuesta de refuerzo de la fiebre aftosa. *Trials Vaccinol* 4:38-42.
 91. Trueblood ES, Brown WC, Palmer GH, Davis WC, Stone DM, McElwain TF. (1998). B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J Virol* 72:3169-3177.
 92. Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med* 94:54–64.
 93. Worobey M, Holmes EC. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80:2535–2543.
 94. Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z. (1998). Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet Immunol Immunopathol* 64:207-218