



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS QUE CAUSAN ABORTOS EN
BOVINOS CON ENFOQUE EN RODEOS LECHEROS DE URUGUAY**

CAROLINE DA SILVA SILVEIRA, MV, MSc

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2019**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS QUE CAUSAN ABORTOS EN
BOVINOS CON ENFOQUE EN RODEOS LECHEROS DE URUGUAY**

CAROLINE DA SILVA SILVEIRA, MV, MSc

Franklin Riet-Correa
Director de Tesis

Federico Giannitti
Co-director

2019

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Andrés Gil; DV, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

**Gustavo Gastal; MV, MS, PhD
Plataforma en Salud Animal
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – INIA**

**José Verdes; DV, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

2019

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Programa de Posgrados

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 26 de setiembre de 2019

TRIBUNAL: Dr. José M. Verdes (Presidente), Dr. Andrés Gil, Dr. Gustavo Gastal

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
DI : 5098307571	DA SILVA SILVEIRA, Caroline	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. José M. Verdes (Presidente)

Dr. Andrés Gil

Dr. Gustavo Gastal

FIRMA

José M. Verdes
Andrés Gil

Gustavo Gastal

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Defensa de Tesis pueden ser:
B.B.B.-6 o S.S.S.-12



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Programa de Posgrados

**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL**

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS QUE CAUSAN ABORTOS EN
RODEOS LECHEROS DE URUGUAY**

Por: Caroline DA SILVA SILVEIRA

**Director de Tesis: Dr. Franklin Riet-Correa
Codirector de Tesis: Dr. Federico Giannitti**

Tribunal

Presidente: Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro: Dr. Andrés Gil

Tercer Miembro: Dr. Gustavo Gastal

Fallo del Tribunal: *Aprobada con Mención*

Montevideo, 26 de setiembre de 2019

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)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia que me apoyo en todos los momentos durante estos tres años en el Uruguay. Principalmente a mis padres, Carlos Augusto y Marlise, que son indispensables en mi vida. Ellos son las personas que siempre estuvieron presentes desde los primeros pasos en mi formación, siempre auxiliando y manteniendo vivos mis valores y carácter. Ustedes son mi mayor amor.

Agradezco a mi compañero de vida, Edgardo Rey, que estuvo presente todos los días de esta gran jornada. Llenó mis días de amor y cariño, me incentivó todas las mañanas con las palabras: “Vamo arriba, que ese sea tu mejor día, éxitos!”. Esta conquista también es tuya, gracias.

Agradezco a los investigadores de la Plataforma en Salud Animal (PSA) y todas las otras instituciones del Uruguay que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Principalmente a mi tutor Franklin Riet-Correa, que es un ejemplo de persona y profesional, que creyo en mi más de lo que yo misma. Estuvo presente en los dos momentos más difíciles en este camino, hizo de todo para que yo pudiera pasar por esas fases donde pensaba en desistir y volver con mi familia que estaba pasando por momentos delicados. Su apoyo fue fundamental para seguir adelante. Este hombre me hizo crecer como persona y principalmente como profesional, siempre seré agradecida y con seguridad voy a retribuirlo por tanta confianza.

A Federico Giannitti, por la paciencia con la que me ayudo a entender la neosporosis. A mirar muchas láminas histológicas y por el compañerismo al armar los casos de la AFIP y mucho más. Gracias por las pequeñas actitudes que hicieron la diferencia y por su amistad.

A mi querido amigo Martin Fraga, fuiste fundamental en este trabajo. Fueron días en el laboratorio de microbiología y muchos más arriba de un manuscrito. ¿Que sería del año 2018 si vos no hubieras estado presente? Sos una gran persona, te admiro mucho, gracias por hacer parte de esta historia.

Agradezco mucho al equipo de la PSA, sin ustedes este trabajo no existiría. En especial a mis amigas de oficina, Ana Rabazza, Melissa Macías-Rioseco y Laura Casaux, nosotras allí adentro vivimos lo que realmente es el posgrado. Ricardo Almeida, por estar a mi lado siempre, nosotros estamos creciendo juntos. Meli, te agradezco con todo mi corazón, este trabajo es nuestro!

A ANII y al INIA por la financiación de este estudio y de la beca doctoral.

Agradezco a los productores rurales criadores de bovinos de leche, que abrieron sus porteras para la realización de ese trabajo, gracias por la confianza.

¡GRACIAS URUGUAY!

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	5
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVO GENERAL	14
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
6. CAPÍTULO 1: NEOSPOROSIS, LEPTOSPIROSIS, CAMPILOBACTERIOSIS, TRICOMONIASIS Y DIARREA VIRAL BOVINA EN RODEOS LECHEROS DE URUGUAY.....	16
7. CAPÍTULO 2: DIAGNÓSTICO DE LA CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA EN AMÉRICA DEL SUR.....	41
8. CAPÍTULO 3: ESTUDIO COMPARATIVO DE ELISAs COMERCIALES PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LA INVESTIGACIÓN DIAGNÓSTICA DEL ABORTO ASOCIADO A <i>Neospora caninum</i> EN RODEOS DE BOVINOS LECHEROS DE URUGUAY	57
9. CAPÍTULO 4: ENFERMEDADES ASOCIADAS AL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SUBTIPOS 1a y 2b EN BOVINOS DE CARNE Y LECHE DEL URUGUAY.....	70
10. CAPÍTULO 5: DETECCIÓN DE <i>Tritrichomonas foetus</i> POR PCR EN ESMEGMA PREPUCIAL DE TOROS EN URUGUAY	89
11. CONSIDERACIONES FINALES	98
12. REFERENCIAS	100
13. ANEXOS	117

RESUMEN

Estudios realizados en Uruguay muestran que las principales causas de aborto en bovinos son de origen infeccioso. El diagnóstico etiológico de pérdidas reproductivas en bovinos es complejo, y la identificación y determinación de las prevalencias de los diferentes agentes involucrados puede ser realizada mediante el uso de diferentes técnicas de laboratorio aplicables sobre muestras del feto, de la madre que abortó, del toro y/o del rodeo. El objetivo de este trabajo fue estudiar a nivel poblacional la neosporosis, la leptospirosis, la campilobacteriosis, la tricomoniasis y la diarrea viral bovina mediante técnicas directas e indirectas utilizadas en el abordaje diagnóstico de enfermedades infecciosas abortivas. Para esto, fueron realizados los diagnósticos en muestras clínicas de bovinos recibidas entre los años 2016 y 2019 en la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) para el diagnóstico de patógenos involucrados con pérdidas reproductivas. Además, se muestrearon, por conveniencia, los rodeos de 20 tambos para determinar la prevalencia de dichas enfermedades y factores asociados en esta población de estudio. Para *Neospora caninum* se determinó una seroprevalencia de 36,1% de las vacas en ordeño (406/1200) y 100% (20/20) de los predios positivos a *N. caninum*. Se demostró que la presencia de perros nacidos en los tambos está asociada a una mayor seroprevalencia a este parásito ($p=0,001$). Además del kit ELISA utilizado para determinar la prevalencia en este estudio, otros 2 kits ELISA comerciales fueron comparados entre ellos para una aproximación diagnóstica del aborto por *N. caninum* en bovinos lecheros en la región de este estudio. Resultando en una variación de débil a fuerte entre los kits (coeficiente Kappa de Cohen=0.58 a 0.83), sin embargo, los 3 kits fueron eficaces en la asociación del aborto con la seropositividad a *N. caninum*. Para *Leptospira* spp. se observó que 19,4% de los animales fueron seroreactivos al menos a uno de los serovares evaluados. El serovar más prevalente fue Pomona con 24,7%, pero no hubo asociación estadística entre aborto y seropositividad para los serovares estudiados. La qPCR reveló que 0,35% (4/1138) de los sueros de las vaquillonas analizadas fueron positivos para vDVB y el subtipo identificado fue el BVDV-1a. Se identificaron BVDV-1a y BVDV-2b asociado a los casos clínicos de enfermedad de la mucosa, infecciones transitorias postnatales asociadas con salmonelosis entérica y septicémica, bronconeumonía por *Histophilus somni*, coinfecciones del tracto urinario con *Escherichia coli* y *Streptococcus* sp., coinfección entérica con coccidios, infecciones fetales transplacentarias y abortos con coinfección por *N. caninum*. Por PCR se detectó que en 2,25% (7/310) de los toros (leche: 6/121 y carne: 1/189) muestreados fueron positivos para *Tritrichomona foetus*.

Campylobacter fetus venerealis no fue diagnosticado en ninguna de las muestras prepuciales analizadas. La determinación de las frecuencias de los agentes que causan abortos sugiere, en esta población de estudio, que neosporosis es la principal enfermedad involucrada en las pérdidas gestacionales en los rodeos lecheros. Además, el desarrollo y validación de un kit ELISA comercial anti-*N. caninum* se hace necesario para minimizar costos de diagnósticos una vez que la serología es una herramienta clave para el control de la enfermedad. La detección de *T. foetus* en toros revela que este protozoo sigue circulando en el país. Futuros estudios deberían estimar el impacto económico de BVDV en bovinos en Uruguay, debido a las evidencias de que el virus está asociado con enfermedad y muerte de bovinos en los rodeos uruguayos. Un avance importante registrado en este proyecto es el desarrollo de técnicas de diagnóstico que permitirán, no solo el diagnóstico, sino también la continuidad de los trabajos de investigación para estudiar la epidemiología, la importancia económica y los métodos de control para las diferentes enfermedades reproductivas en el ganado lechero y cárnico del Uruguay.

PALABRAS CLAVE: abortos bovinos, campilobacteriosis, diarrea viral bovina, leptostirosis, neosporosis, tricomoniasis.

SUMMARY

Studies in Uruguay show that the main cause of abortion in cattle are of infectious origin. Considering the complexity of the etiological diagnosis of reproductive losses in cattle, the identification and determination of the prevalence of the different agents involved can be done using different laboratory techniques on samples of the fetus, the aborted dam, the bull and/or the herd. The objective of this work was to study neosporosis, trichomonosis, campylobacteriosis, leptospirosis, and bovine viral diarrhea by direct and indirect techniques used in the diagnostic approach of abortive infectious diseases. For this, different diagnostic tests were carried out from clinical samples of bovines that arrived between 2016 and 2019 in the PSA for the diagnosis of pathogens involved in reproductive losses. In addition, the herds of 20 dairy farms were sampled for convenience to determine the prevalence of these diseases and associated factors in this study population. A seroprevalence of 36.1% of the dairy cow (406/1200) and 100% (20/20) of the positive farms for *N. caninum* was determined. It was shown that the presence of dogs born in dairy farms is associated with a greater seroprevalence to this parasite ($p = 0.001$). In addition to the ELISA kit used to determine the prevalence in this study, another 2 commercial ELISA kits were compared to each other for a diagnostic approach to abortion by *N. caninum* in dairy cattle in the region of this study. It was determined a variation from weak to strong among the kits (Cohen's Kappa coefficient = 0.58 to 0.83), however, all 3 kits were effective in the association of abortion with seropositivity to *N. caninum*. For *Leptospira* spp. it was observed that 19.4% of the animals were seroreactive to at least one of the serovars evaluated. The most prevalent serovar was Pomona with 24.7%, but there was no statistical association between abortion and seropositivity for the serovars studied. The qPCR revealed that 0.35% (4/1138) of the sera of the heifers analyzed were positive for vDVB and the subtype identified was BVDV-1a. BVDV-1a and BVDV-2b were associated with clinical cases of mucosal disease, postnatal transient infections associated with enteric and septicemic salmonellosis, *Histophilus somni* bronchopneumonia, urinary tract coinfections with *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp., enteric coinfection with coccidia, and transplacental fetal infections and abortions with coinfection by *N. caninum*. By PCR it was detected that in 2.25% (7/310) of the bulls (milk: 6/121 and beef: 1/189) sampled were positive for *Tritrichomonas foetus*. *Campylobacter fetus venerealis* was not diagnosed in any of the prepuccial samples analyzed. The determination of the frequencies of the agents that cause abortions suggests, in this study

population, that neosporosis is the main disease and may be involved in gestational losses in dairy herds. In addition, the development and validation of a commercial anti-*N. caninum* ELISA kit becomes necessary to minimize diagnostic costs once serology is a key tool for disease control. The detection of *T. foetus* in bulls reveals that this protozoan continues to circulate in the country. Future studies should estimate the economic impact of BVDV in cattle in Uruguay, due to the evidence that the virus is associated with bovine disease and death in Uruguayan herds. An important advance registered in this project is the development of diagnostic techniques that will allow, not only the diagnosis, but also the continuity of research works to study the epidemiology, economic importance and control methods for the different reproductive diseases in dairy and meat cattle in Uruguay.

KEYWORDS: bovine abortion, bovine viral diarrhea, campylobacteriosis, leptospirosis, neosporosis, trichomoniasis.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1.1. Situación productiva y sanitaria del ganado lechero de Uruguay

La producción de leche bovina tiene un importante papel social y económico en Uruguay. En 2017 se destinaron a esta actividad 827 000 hectáreas (5% del territorio nacional), y la producción alcanzó los 2 049 millones de litros de leche, lo que cubrió el consumo interno (255 litros/persona) y generó exportaciones por US\$ 594 129 000, representando el 7,5% del total de exportaciones del país. En el mismo año las existencias de ganado lechero fueron de 780 000 cabezas, de las cuales al menos 438 000 (56%) eran hembras en edad reproductiva (vacas masa) (DIEA, 2018).

Las existencias de ganado lechero nacional se han mantenido relativamente estables en la última década (DIEA, 2018), lo que puede ser atribuido, al menos en parte, a factores que impactan negativamente en el crecimiento de los rodeos, incluyendo: la alta mortalidad de terneros (15,8% de mortalidad entre 0-73 días de vida) (Schild, 2017), las pérdidas reproductivas (Rovere et al., 2007), y la alta tasa de descarte de vacas, que llega hasta 20% en el país (INALE, 2014).

Las enfermedades reproductivas del ganado que causan infertilidad y aborto son una de las principales responsables por los perjuicios económicos del sector lácteo (Weersink et al., 2002; De Vries, 2006). Estas enfermedades están asociadas a la pérdida de terneros, pérdidas en producción de leche, aumento de los costos de alimentación en categorías improductivas, gastos reproductivos (toros, inseminación artificial, mano de obra, etc.) y los posibles efectos negativos en la fertilidad futura de las hembras, que redundan en descarte prematuro de animales y disminución de las tasas de reposición (De Vries, 2006; Gädicke & Monti, 2008). Aunque en Uruguay se desconoce el monto de estas pérdidas a nivel nacional, en un estudio plurianual realizado en 10 tambos del país se estimó que en aproximadamente 14% de las hembras gestantes abortan (Dr. Carlos Lemaire -Ejercicio liberal-, comunicación personal).

Las pérdidas reproductivas, por infertilidad, muerte embrionaria y abortos, pueden ser consecuencia de una variedad de causas, incluyendo agentes infecciosos, factores hormonales, genéticos y/o hereditarios, exposición a agentes farmacológicos, tóxicos, ambientales, y/o nutricionales en momentos críticos de la gestación (Grimard et al., 2006; Anderson, 2007; Clothier & Anderson, 2016; Briano et al., 2019). La determinación de la etiología de las pérdidas gestacionales en vacas lecheras es fundamental para controlar y

prevenir dichas pérdidas a nivel de rodeos, así como desde el punto de vista de la salud pública y seguridad alimentaria, considerando que varios de los microorganismos causales de aborto en bovinos son zoonóticos.

El diagnóstico etiológico del aborto bovino es complejo (Gädicke & Montib, 2008); requiere de la remisión de fetos y placentas de vacas o vaquillonas abortadas y que los laboratorios cuenten con las técnicas diagnósticas adecuadas para la detección de diversos agentes abortigénicos (Campero et al., 2003). En la mayoría de los países sudamericanos, las producciones ganaderas tienen lugar principalmente en condiciones de pastoreo, situación imperante en tambos de Uruguay, lo que dificulta la recuperación de fetos y placentas expulsados espontáneamente por vacas que abortaron, lo que representa una complicación adicional para el diagnóstico laboratorial del aborto bovino (Campero et al., 2003). Además, cuando son recuperados, los fetos y placentas disponibles para ser remitidos al laboratorio de diagnóstico suelen estar autolisados, contaminados y/o depredados, dificultando la detección de los agentes etiológicos y la posibilidad de observar lesiones tisulares que son de importancia diagnóstica (Campero et al., 2003; Antoniassi et al., 2013). Esto torna fundamental el conocimiento, estandarización e interpretación de pruebas diagnósticas a nivel de rodeos como alternativa para la asociación con pérdidas gestacionales cuando no es posible obtener fetos abortados.

Varias enfermedades que causan abortos en bovinos han sido estudiadas a nivel nacional (Repiso et al., 2005; Bañales et al., 2006; Easton, 2006; Macías-Rioseco, 2019) e internacional (Anderson et al., 1990; Kim et al., 2002; Campero et al., 2003; Khodakaram-Tafti & Ikede, 2005; Corbellini et al., 2006; Anderson, 2007; Fernández et al., 2007; Morrell, 2010; Antoniassi et al., 2013; Clothier & Anderson, 2016), en diferentes regiones y sistemas productivos. Entre las diversas etiologías, se destacan las de origen infeccioso causadas por protozoarios, bacterias, virus y hongos, la mayoría de las cuales están presentes en rodeos de todo el mundo (Kim et al., 2002; Fernández et al., 2007, Anderson, 2007; Morrell, 2010; Antoniassi et al., 2013; Anderson & Clothier, 2016). En Uruguay, las enfermedades infectocontagiosas fueron las principales causas de abortos encontradas por la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) Miguel C. Rubino en el período 2002-2005, incluyendo *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, *Campylobacter fetus*, *Brucella abortus*, virus de la diarrea viral bovina (vDVB) y herpesvirus bovino-1 (HVB-1) (Easton, 2006). Más recientemente, Macías-Rioseco (2019), reportó a partir de un estudio de serie de 102 casos (53 fetos, 35 fetos con placentas y 14 placentas) en un período de 3 años (2015/2018), que 50% (51) de los casos estudiados respondían a una causa infecciosa, con frecuencias de

29,4% de fetos y/o placentas abortados por *Neospora caninum* (30 casos), seguido por *Coxiella burnetii* en 6 casos (5,9%), *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* en dos casos (2%) y en menor frecuencia infecciones por *Escherichia coli*, virus de la parainfluenza-3 bovina, *Salmonella enterica* sorovar Newport, *Trueperella pyogenes*, *Mannheimia* spp., *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (13 casos en total, 12,7%).

1.2. Neosporosis bovina

Neospora caninum es un protozooario intracelular obligado del filo Apicomplexa, cuyo hospedador definitivo es el perro y otros carnívoros (lobos, coyotes y dingos), que eliminan oocistos infecciosos en las heces (Dubey & Schares, 2011). La transmisión a los bovinos puede ocurrir por vía digestiva (transmisión horizontal) y también más frecuentemente por vía transplacentaria (transmisión vertical), esa última con tasas reportadas de 40-95% entre los terneros nacidos de vacas seropositivas (Reichel et al., 2014).

Este parásito fue identificado como causa de aborto en bovinos mundialmente (Dubey & Schares, 2011), incluyendo Uruguay (Kashiwazaki et al., 2004; Bañales et al., 2006; Easton, 2006, Macías-Rioseco, 2019). Las prevalencias de anticuerpos contra *N. caninum* en el país varían entre 13% y 28% a nivel individual y 61,3 y 76,8% a nivel predial, tanto en ganado de carne como de leche (Kashiwazaki et al., 2004; Piaggio et al., 2004; Repiso et al., 2005; Bañales et al., 2006; Furtado et al., 2011). Un estudio de representatividad nacional realizado en 2015 indicó prevalencias prediales de 86,5% y 96% para establecimientos de carne y leche, respectivamente, y prevalencias individuales de 22,3% en ganado lechero, y de 14,3% en ganado de carne (Dr. Federico Fernández, MGAP, comunicación personal 2018).

La serología es un indicador que permite evaluar la chance de que las vacas seropositivas a *N. caninum* aborten (Roelandt et al., 2015) y seguido de decisiones de gestión adecuadas es actualmente la única opción para controlar neosporosis bovina (Guido et al., 2016). Debido a esto, el país debería contar con un kit de ELISA comercial de fácil aplicabilidad e interpretación y para disminuir los costos del diagnóstico, para que estos factores sean un incentivo a los productores para la realización de un plan de control en sus establecimientos.

1.3. Campilobacteriosis genital bovina y Tricomoniasis bovina

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) y la tricomoniasis bovina (TB) son enfermedades de transmisión venérea que causan generalmente infertilidad, muerte embrionaria y abortos (Catena et al., 2003; BonDurant, 2005; Rae & Crews, 2006; Ondrak, 2016). Los toros son portadores y diseminadores asintomáticos en el momento del coito de estas enfermedades (Eglesome & Garcia, 1992). Los microorganismos se alojan en las criptas prepuciales y en la mucosa peneana de los toros sin afectar la libido ni la calidad del semen (BonDurant, 2005).

La CGB es causada por un bacilo Gram-negativo, curvo, móvil, con uno o dos flagelos polares de la especie *Campylobacter fetus* (Clark, 1971). La especie comprende tres subespecies: *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* (*Cff*) (Véron & Chatelain, 1973), *Campylobacter fetus* subespecie *testudinum* (Fitzgerald et al., 2014), y *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* (*Cfv*) que puede incluir el biotipo *intermedius* (Eaglesome & Garcia, 1992; Van Bergen et al., 2005), siendo la última responsable de la enfermedad (OIE, 2017). La CGB es una enfermedad de distribución mundial (Mshelia et al., 2010) y que también está asociada con grandes pérdidas reproductivas en América del Sur (Silveira et al., 2018).

En Uruguay, la CGB fue diagnosticada por primera vez en ganado lechero hace varias décadas (Stella & Canabez, 1971). En un importante estudio nacional en toros dedicados a la explotación de carne, se evaluaron 1754 muestras de esmegma prepucial de toros y se determinó por inmunofluorescencia directa (IFD) una prevalencia individual de 28% de toros positivos en 142 de 230 establecimientos (37%) (Repiso et al., 2005). Actualmente, se determinó una prevalencia individual de 2,2% y 2,9% por cultivo y por PCR cuantitativa (qPCR) respectivamente, a nivel predial la prevalencia fue 9,7% por cultivo y 12,9% por qPCR en un total de 315 toros que fueron enviados a faena provenientes de 62 establecimientos (Delpiazzo et al, 2019).

La TB es una enfermedad reconocida mundialmente (Yao, 2013), y es causada por un protozooario extracelular flagelado móvil de la especie *Trichomonas foetus* (Rae & Crews, 2006). Dicha enfermedad es responsable por una reducción importante en la tasa de preñez (aproximadamente 57% de vacas no preñadas) al final del servicio, afectando directamente la performance reproductiva, pudiendo causar una reducción del 14% al 50% de terneros al pie a nivel predial (Ondrak, 2016).

Cassamagnghi y Cassamagnghi (1944), realizaron por primera vez el diagnóstico de TB en tambos de Uruguay. Décadas después, se observó una frecuencia de 6,5% (50/768) de establecimientos positivos a *T. foetus* en la cuenca lechera del país (Errico et al., 1978; Herrera et al., 1986). Easton (2006) describió la observación del parásito por campo oscuro

en el líquido abomasal de un feto bovino abortado en asociación con *Cfv*. En toros de carne, en un estudio nacional, no se diagnosticaron por cultivo a partir de muestras de esmegma prepucial, toros positivos para *T. foetus* (Repiso et al., 2005). Debido que en el país no fueron creados programas de control y erradicación de este protozoario, es curioso que *T. foetus* no haya sido detectado en los rodeos bovinos en los últimos 13 años.

1.4. Diarrea viral bovina

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) pertenece al género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*, y tiene amplia distribución mundial (Ridpath et al., 2010; Yesilbağ et al., 2017). Tres genotipos del vDVB asociados a enfermedad han sido descritos: vDVB-1, vDVB-2 (Smith et al., 2017) y vDVB-3 o Pestivirus H (*Pestivirus* HoBi-like) (Bauermann et al., 2012; Smith et al., 2017). En América del Sur, incluyendo Uruguay (Maya et al., 2016), las infecciones por el vDVB-1 y -2 han sido bien documentadas (Odeón et al., 2009; Ståhl et al., 2009; Weber et al., 2014; Villamil et al., 2018), mientras que el virus tipo HoBi solo se ha identificado hasta ahora en Argentina (Pecora et al., 2017) y Brasil (Dias et al., 2017).

La infección de vacas o vaquillonas preñadas con el vDVB puede causar mortalidad embrionaria, abortos, malformaciones congénitas y nacimiento de terneros persistentemente infectados, que mantienen el virus en el rodeo (Flores & Schuch, 2007).

En Uruguay, las primeras evidencias de circulación de vDVB datan de 1996 (Saizar, 1998), y un estudio seroepidemiológico nacional realizado en bovinos de carne durante 2000 y 2001 reveló que 100% (n=230) de los establecimientos y 69% de los animales presentaron anticuerpos contra el vDVB-1 y -2 (Guarino et al., 2008). Más recientemente, se observó la infección activa por vDVB y los genotipos circulantes en rodeos de ganado de carne y leche con problemas reproductivos, resultando que el subgenotipo predominante es el vDVB-1a, seguido de vDVB-1i y vDVB-2b (Maya et al., 2016). Sin embargo, en la literatura científica no hay descripciones clinicopatológicas de enfermedades asociadas a infección por vDVB en Uruguay, desconociéndose además el impacto que las mismas podrían tener en distintos sistemas de producción bovina del país.

1.5. Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis mundialmente distribuida causada por una espiroqueta patógena del género *Leptospira* (Picardeau, 2017). Esta enfermedad es

extremadamente importante en la industria pecuaria debido a que causa pérdidas económicas en consecuencia de que provoca problemas reproductivos (abortos, mortinatos e infertilidad) y productivos (disminución en la producción lechera) en rodeos bovinos (Ellis, 2015).

Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo (Hardjobovis) es el serovar que tiene a los bovinos como hospedadores de mantenimiento, sin embargo, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (Hardjoprajitno) también está reportada como serovar adaptada a esta especie animal (Ellis, 2015). Ambos serovares tienen la capacidad de colonizar y persistir en el tracto genital de vacas y toros infectados, lo que sugiere que la transmisión venérea puede ser un factor en la diseminación (Campero et al., 2017). El serogrupo Pomona, que no está adaptado al bovino, provoca infecciones accidentales con episodios de abortos, natimortos y mortalidad de terneros (Ellis, 1994; Draghi et al., 2011). Cantón et al., (2006) reportaron episodios de pérdidas reproductivas asociadas a elevados títulos de anticuerpos contra los serovares *L. Hardjo* y *L. Wolffii*.

Estudios serológicos demostraron que *Leptospira* es un agente que está ampliamente distribuido en Uruguay, donde se encontró hasta 38,5% (2.410/6.261) de bovinos de cría con anticuerpos para *Leptospira* spp., siendo mayormente observada una frecuencia de anticuerpos para los serovares Hardjo y Wolfii seguidos de Pomona (Repiso et al., 2005), serovares que pueden estar involucrados con pérdidas reproductivas. La proporción de fetos abortados enviados al DILAVE con diagnóstico de leptospirosis fue extremadamente alta (41%) (Easton, 2006), comparada con la frecuencia relativa de abortos causados por *Leptospira* spp. identificados en series de casos en otros países de la región y del mundo (Anderson et al., 1990; Campero et al., 2003; Anderson, 2007; Morrell, 2010; Anderson & Clothier, 2016). Dicha proporción fue alta incluso en comparación con un reciente estudio en bovinos abortados en la cuenca lechera uruguaya, que en un periodo de 3 años (2015-2018) no identificó abortos causados por *Leptospira* spp. en una serie de 102 casos, a pesar de detectar ADN de *Leptospira* spp. por PCR en un feto que no presentaba lesiones macro o microscópicas típicamente atribuibles a leptospirosis (Macías-Rioseco, 2019).

Recientemente, un importante estudio en el país reportó el aislamiento y la tipificación de 40 cepas de *Leptospira* spp. autóctonas de bovinos naturalmente infectados, aislándose con mayor frecuencia cepas de *L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Kennewicki (Zarantonelli et al., 2018). Además de que es un serovar reportado como causa de abortos en el ganado (Draghi et al., 2011) y fue encontrado circulando en bovinos naturalmente infectados en Uruguay, el mismo estudio reveló que el genotipo de dicho

serovar es idéntico a aislados de *Leptospira* de pacientes humanos (trabajadores rurales), tornando aún más preocupante el potencial zoonótico de esta enfermedad en el país (Zarantonelli et al., 2018).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Uruguay las enfermedades reproductivas del ganado que causan infertilidad y aborto son una de las principales responsables por los perjuicios económicos del sector lácteo (Weersink et al., 2002; De Vries, 2006) y recientemente la frecuencia en rodeos lecheros y de cría de dichas enfermedades fueron actualizadas (Dr. Federico Fernández, MGAP, comunicación personal 2018). Sin embargo, la información sobre protocolos de técnicas diagnósticas confiables, rápidas y de costo accesible a nivel de rodeo es escasa y se encuentra dispersa en los diferentes grupos que trabajan en salud animal en el país. A pesar del conocimiento de algunas de estas enfermedades, aún no hay total confiabilidad del productor rural, del veterinario de ejercicio liberal y de los laboratorios veterinarios de la aplicación e interpretación adecuada de las técnicas diagnósticas disponibles a nivel de rodeo en asociación con pérdidas reproductivas.

La evaluación de dichas pruebas y su aplicabilidad en la rutina del campo y laboratorios veterinarios en conjunto con datos epidemiológicos de las enfermedades que causan aborto ayudaría a reducir dichas pérdidas y daría lugar a una mayor eficiencia reproductiva, productiva y económica al sector.

3. HIPÓTESIS

- La neosporosis, leptospirosis, campilobacteriosis, tricomoniasis y diarrea viral bovina son importantes causas de pérdidas reproductivas y son prevalentes en rodeos lecheros de Uruguay.
- La ocurrencia de animales positivos para el vDVB en los tambos implica posiblemente en la presencia de animales persistentemente infectados y con cuadros clínicos asociados al agente.
- La campilobacteriosis y tricomoniasis son enfermedades venéreas que están presentes en los rodeos lecheros en Uruguay, la definición del uso de las diferentes pruebas diagnósticas son necesarias para aumentar la eficiencia del diagnóstico y la toma de decisiones referente a su control y prevención.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar a nivel poblacional la neosporosis, la leptospirosis, la campilobacteriosis, la tricomoniasis y la diarrea viral bovina en tambos de Uruguay y su asociación con pérdidas reproductivas en el periodo entre 2016 y 2019.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* y *Leptospira* spp. y establecer a través de un cuestionario posibles factores asociados a estas enfermedades en rodeos bovinos lecheros.
- Evaluar el uso de diferentes pruebas para el diagnóstico de las enfermedades venéreas (campilobacteriosis genital bovina y tricomoniasis bovina).
- Identificar enfermedades clínicas en bovinos infectados por el vDVB e infecciones activas en vaquillonas de establecimientos lecheros.
- Reportar la utilización de diferentes técnicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas que causan trastornos reproductivos en rodeos bovinos lecheros con historial de abortos.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se recibieron muestras clínicas entre los años 2016 y 2019 en la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) de INIA La Estanzuela para el diagnóstico directo o indirecto de patógenos involucrados a las pérdidas reproductivas en el establecimiento remitente. Dichas muestras se procesaron mediante pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas establecidas en esta tesis como causales de pérdidas reproductivas.

Para verificar la posible aplicabilidad en la rutina diagnóstica de las técnicas directas e indirectas descritas en esta tesis y determinar la prevalencia de las enfermedades abortivas, se realizó un muestreo en 20 tambos con historial de abortos.

En los tambos mencionados se realizaron:

- 1) un cuestionario (Anexo 1) para conocer los antecedentes e historia clínica de los rodeos, manejo general, nutricional y reproductivo, datos epidemiológicos, índices reproductivos y posibles factores asociados a enfermedades infecciosas;
- 2) análisis serológicos para detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* y *Leptospira* spp.;
- 3) pruebas moleculares para la detección del genoma del vDVB; y
- 4) evaluación microbiológica y molecular de esmegma prepucial de toros aptos para la reproducción, para detección de *Campylobacter fetus venerealis* y *Tritrichomonas foetus*.

6. CAPÍTULO 1: NEOSPOROSIS, LEPTOSPIROSIS, CAMPILOBACTERIOSIS, TRICOMONIASIS Y DIARREA VIRAL BOVINA EN RODEOS LECHEROS DE URUGUAY

RESUMEN

Las enfermedades reproductivas son una de las principales causas de pérdidas económicas para los productores lecheros e impactan negativamente en el crecimiento de los rodeos. En Uruguay, entre las diversas etiologías, las enfermedades infectocontagiosas son las causas de abortos más frecuentemente identificadas en bovinos. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de neosporosis, leptospirosis, campylobacteriosis, tricomoniasis y diarrea viral bovina en rodeos bovinos lecheros del Uruguay. Para eso se utilizaron 20 tambos ubicados en la región sur del país y se muestrearon 1200 vacas en ordeño de un total de 4208 para el diagnóstico serológico de *N. caninum* y *Leptospira* spp. El diagnóstico del vDVB fue realizado por PCR en muestras de suero de todas las vaquillonas disponibles en los establecimientos (n=1138). De todos los toros aptos para la reproducción en los tambos (n=63) se obtuvo el esmegma prepucial y por IFD, cultivo y PCR fue realizado el diagnóstico de campilobacteriosis y tricomoniasis. Además, un cuestionario fue aplicado para determinar los factores asociados con el aborto por neosporosis y leptospirosis. Se determinó una seroprevalencia de 36,1% (IC: 33,3 – 38,8%) de las vacas en ordeño y 100% de los predios positivos a *N. caninum*. Se demostró que la presencia de perros nacidos en los tambos está asociada a una mayor seroprevalencia a este parásito (p=0,001). Para *Leptospira* spp. se observó que 19,4% de los animales fueron seroreactivos al menos a uno de los serovares evaluados. El serovar más prevalente fue Pomona con 24,7% (IC: 21,1 – 29%), pero no hubo asociación estadística entre aborto y seropositividad para los serovares estudiados. La qPCR reveló que 0,35% (4/1138) de los animales analizados fueron positivos para vDVB y el subtipo identificado fue el BVDV-1a. Por PCR se detectó que el 9,5% (6/63) de los toros analizados fueron positivos para *T. foetus* en un único tambo. *Campylobacter fetus venerealis* no fue diagnosticado en ninguna de las muestras prepuciales analizadas. La determinación de las frecuencias de los agentes que causan abortos sugiere, en esta población de estudio, que neosporosis es la principal enfermedad y puede estar involucrada en las pérdidas gestacionales en los rodeos lecheros. Además, la detección de *T. foetus* en toros revela que este protozooario sigue circulando en el país.

Palabras clave: enfermedades abortivas, bovinos de leche, enfermedades venéreas, diagnóstico, toros, pérdidas reproductivas.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reproductivas del ganado que causan infertilidad y aborto son una de las principales responsables por los perjuicios económicos del sector lácteo (Weersink et al., 2002; De Vries, 2006). Están asociadas a la pérdida de terneros, pérdidas en producción de leche, aumento de los costos de alimentación en categorías improductivas, gastos reproductivos y posibles efectos negativos en la fertilidad futura de las hembras, que

redundan en descarte prematuro de animales y disminución de las tasas de reposición (De Vries, 2006; Gädicke & Monti, 2008)

Actualmente en Uruguay, la producción lechera representa el equivalente a 7,5% del total de exportaciones del país, teniendo gran impacto económico a nivel nacional (DIEA, 2018). La rentabilidad de la industria lechera depende fundamentalmente del éxito de manejo y desempeño de la producción bovina de leche. Sin embargo, las existencias de ganado lechero durante la última década se han mantenido relativamente estables (DIEA, 2018). Se sabe que en el país 15,8% de los terneros dedicados a la lechería mueren antes del desleche (Schild, 2017), la tasa de descartes de vacas llega hasta 20% (INALE, 2014) y se sugiere que las pérdidas reproductivas están impactando negativamente en el crecimiento de los rodeos (Rovere et al., 2007).

La etiología de las pérdidas gestacionales en bovinos, debido a infertilidad y abortos, es compleja y multifactorial (Gädicke & Montib, 2008). Las causas de estas pérdidas pueden estar asociadas a diferentes factores, como: hormonales, genéticos y/o hereditarios, exposición a agentes farmacológicos, tóxicos, ambientales, nutricionales o infecciosos en momentos críticos de la gestación (Grimard et al., 2006; Anderson, 2007; Clothier & Anderson, 2016; Briano et al., 2019).

En Uruguay, entre las diversas etiologías, las enfermedades infectocontagiosas son frecuentemente reportadas como causas de abortos en bovinos (Kashiwazaki et al., 2004; Easton, 2006; Macías-Rioseco, 2019). Recientemente, un estudio en 102 casos de abortos provenientes de establecimientos lecheros describió una frecuencia de 50% (51 casos) de abortos infecciosos, incluyendo 29,4% de abortos por *Neospora caninum* (30 casos), seguido por *Coxiella burnetii* (5,9%, 6 casos), *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (2%, 2 casos) y en menor frecuencia infecciones por *Escherichia coli*, virus de la parainfluenza-3 bovina, *Salmonella enterica* serovar Newport, *Trueperella pyogenes*, *Mannheimia* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., y otras bacterias oportunistas (conjuntamente 12,7%, 13 casos) (Macías-Rioseco, 2019).

Neospora caninum ha sido identificado mundialmente como causa de aborto en bovinos (Dubey & Schares, 2011). En Uruguay, la enfermedad fue reportada con tasas de prevalencia entre 13% y 28% a nivel individual y 61,3 y 76,8% a nivel predial, tanto en ganado de carne como de leche (Kashiwazaki et al., 2004; Piaggio et al., 2004; Repiso et al., 2005; Bañales et al., 2006; Furtado et al., 2011). Actualmente, para bovinos de leche, se determinaron en un estudio de representatividad nacional prevalencias prediales de 21,5% e individuales de 96% (Macchi, 2019).

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) y la tricomoniasis bovina (TB) son enfermedades venéreas de distribución mundial (Mshelia et al., 2010; Yao, 2013). En un estudio en el que se evaluaron 1754 muestras de esmegma prepucial de toros dedicados a carne en el Uruguay, se determinó una prevalencia individual de CGB en 28% de los toros presentes en 142 de 230 establecimientos (37%). En este mismo trabajo, *T. foetus* no fue detectada en ninguna de las muestras (Repiso et al., 2005). Además, en un muestreo realizado en toros de faena *Campylobacter fetus* fue detectado por qPCR en 2,9% del total de 315 toros que fueron enviados a faena (Delpiazzo et al., 2019). *Tritrichomonas foetus* en Uruguay, fue reportada por última vez en el año 2006, en el líquido abomasal de un feto bovino abortado en asociación con *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* (Easton, 2006).

La infección de vacas o vaquillonas preñadas con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) puede causar diferentes presentaciones clínicas dependiendo del período de gestación que afecta a la vaca, llevando a pérdida gestacional o nacimiento de terneros persistentemente infectados (Flores & Schuch, 2007). En Uruguay, las primeras evidencias de circulación de vDVB datan de 1996 (Saizar, 1998), y un estudio seroepidemiológico nacional realizado en bovinos de carne durante 2000 y 2001 reveló que 100% (230) de los establecimientos y 69% de los animales presentaron anticuerpos contra el vDVB-1 y -2 (Guarino et al., 2008). Se determinó que los subgenotipos circulantes en el país son predominantemente el vDVB-1a, seguido de vDVB-1i y vDVB-2b (Maya et al., 2016).

La leptospirosis es una zoonosis mundialmente distribuida (Picardeau, 2017). Estudios serológicos demostraron que es una infección que está ampliamente distribuida en Uruguay, donde se encontró hasta 38,5% (2410/6261) de bovinos de cría con anticuerpos para *Leptospira* spp., siendo observada mayor frecuencia de anticuerpos para los serovares Hardjo y Wolfii seguidos de Pomona (Repiso et al., 2005).

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de neosporosis, leptospirosis, campilobacteriosis, tricomoniasis y diarrea viral bovina en rodeos bovinos lecheros del Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los establecimientos

Los establecimientos seleccionados por conveniencia para este estudio fueron aquellos que enviaron al menos un feto y/o placenta bovina abortado para diagnóstico a la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA. Luego, el veterinario remitente fue contactado y todos los tambos que estuvieron dispuestos a participar de la investigación

fueron incluidos. Los estudios de los fetos y placentas abortados hacen parte de otra tesis doctoral (Macias-Rioseco, 2019) y no son incluidos en este trabajo.

Entre los años de 2016 y 2018 se realizaron muestreos en 20 tambos (establecimientos 1-20) ubicados en la cuenca lechera del país.

Muestreo

Para el muestreo intrarodeo, se eligieron aleatoriamente 60 vacas en ordeño (VO) por cada tambo, sumando una totalidad de 1200 individuos muestreados para diagnóstico serológico de *N. caninum* de un total de 4208 VO. De estas 1200 muestras de suero sanguíneo fueron seleccionadas al azar 500 (25 por establecimiento) para serología de *Leptospira* spp. Se registraron individualmente la edad y historia reciente de aborto de estas vacas (episodio de aborto en un período ≤ 1 mes).

De todas las vaquillonas ≤ 2 años presentes en los establecimientos y que era posible muestrear se obtuvo suero sanguíneo para el diagnóstico molecular de vDVB, totalizando 1138 vaquillonas analizadas. Todas las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena coccígea utilizando una aguja estéril y jeringa descartable por animal. La sangre fue depositada en tubos de 10ml sin anticoagulante y llevadas al laboratorio para obtención de suero.

Fueron muestreados un total de 63 toros que eran utilizados para reproducción (monta natural) en los tambos visitados. Se obtuvo el esmegma prepucial para identificar infecciones por *Campylobacter fetus venerealis* y *Tritrichomonas foetus*. Se registraron la raza y la edad de cada toro muestreado. Los toros aptos para el estudio habían estado en descanso reproductivo por al menos 7 días previo al muestreo. El esmegma fue colectado por el método de raspaje prepucial (Tedesco et al., 1977) con un raspador estéril descartable (metodología descrita detalladamente en el capítulo 4). Cuando fue posible, los toros fueron muestreados repetidamente en forma seriada siguiendo la misma metodología, con intervalos de aproximadamente 7-10 días entre muestreos, hasta completar un total de 3 muestreos, antes de ser considerados negativos para estos agentes.

ELISA para *N. caninum*

Todas las muestras de suero bovino fueron analizadas en INIA La Estanzuela mediante un kit comercial de ELISA indirecto (LSIVet, Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, Lelystad, Países Bajos) que detecta anticuerpos

isotipo IgG específicos contra *N. caninum*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (metodología descrita detalladamente en el capítulo 3).

MAT para *Leptospira* spp.

Los sueros de las 500 vacas seleccionadas en el muestreo fueron analizados en la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) Miguel C. Rubino mediante la técnica de MAT, siguiendo los protocolos de la sección de Leptospirosis de dicha institución, para detectar anticuerpos contra *Leptospira* serovares: Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hardjovovis, Hardjoprajitno y Wolfii. Se utilizó el punto de corte 1/200.

Pruebas moleculares para DVB

La extracción de ADN se realizó en muestras de suero sanguíneo de todas las vaquillonas con el kit QIAamp® cador® Pathogen Mini (QIAGEN®, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para detectar vDVB-1, -2 y el Pestivirus similar a HoBi, se realizó la PCR en tiempo real con el kit de sonda SensiMix™ II (Bioline Reagents Ltd.) y un instrumento Rotor-Gene Q (Qiagen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante (metodología descrita detalladamente en el capítulo 4). El análisis molecular para vDVB fue realizado en el Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte de la UDELAR en Salto.

Detección de *C. fetus venerealis*

Una alícuota de 500 µl de cada muestra de esmegma prepucial recién tomada, fue depositada en una solución formolada para fijación del agente. Se realizó IFD con un kit comercial (Conjugado – Campy / Biotandil Diagnósticos, Argentina) para detección de *Campylobacter fetus* en frotis de esmegma, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el cultivo de *Campylobacter fetus*, cada muestra fue sembrada en medio de agar Skirrow (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y las placas fueron incubadas en microanaerobiosis con sobres comerciales (CampyGen™, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) que promueven una atmósfera de 10% de CO₂ y 5% de O₂, a 37°C por 2-7 días, visualizando las placas cada 48 h (Chaban y col., 2013). Para la diferenciación entre las subespecies *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis* se realizaron pruebas bioquímicas (OIE, 2008). Las técnicas de IFD y de cultivo microbiológico fueron realizadas en INIA La Estanzuela.

Se extrajo el ADN a partir de 500 µL de todas las muestras con un método de ebullición rápida (Schunck et al., 1995). Se utilizó un método de control interno para evaluar

la calidad del ADN extraído. Este método amplifica un fragmento del gen 16S utilizando cebadores universales (Barcellos 2018). El género *Campylobacter* se detectó utilizando un método de PCR que amplifica un fragmento del gen 16S con los cebadores específicos C412F y C1288F (Linton et al. 1996). Las muestras se analizaron para la identificación de especies genéticas y la diferenciación de *Cff* y *Cfv* con un método basado en PCR multiplex (Iraola et al. 2012). Se utilizó 1 µl de ADN en una reacción de 20 µL que contenía 0.5 mM de cada dNTP (Thermo Scientific, EE. UU.), 2 µL de tampón de reacción 1x (Thermo Scientific, EE. UU.), MgCl₂ 2.5 mM (Thermo Scientific, EE. UU.), 0.625 pares de cebadores MG3F / MG4R µM, pares de cebadores nC1165g4F / nC1165g4 0.375 µM y ADN polimerasa Taq de 1,5 U (Thermo Scientific, EE.UU.). Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial durante 3 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, recocido durante 30 segundos a 53°C y extensión durante 1 minuto a 72°C. Los amplicones se separaron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito previamente (Iraola et al., 2016). El ensayo se basa en un conjunto de cebadores que amplifican una secuencia de 78 pb del gen 16S rRNA y una sonda TaqMan-MGB (ligante de surco menor) que se dirige a una región polimórfica de 19 pb que distingue las cepas de *C. fetus* del resto de las especies de *Campylobacter* y otras bacterias. Las muestras se agruparon en grupos de cinco. La PCR en tiempo real se realizó en una reacción de 25 µl que contenía una mezcla maestra de genotipado TaqMan 1x (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.), 1 ensayo de genotipado TaqMan SNP personalizado (0,9 µM para cada cebador y 0,2 µM para la sonda) y 1 µL del ADN genómico agrupado. El termociclado se realizó en un analizador ABIPrism 7500 (Applied Biosystems, FC, EE. UU.). Se identificaron grupos positivos, y el ensayo de qPCR se repitió individualmente para identificar las muestras positivas. Todas las pruebas moleculares fueron realizadas en la sección genética evolutiva de la Facultad de Ciencias (UDELAR).

Detección de *T. foetus*

Para el cultivo se utilizó el medio Trichomonas (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se incubaron a 37°C y alícuotas del cultivo se examinaron en microscopio óptico cada 24 horas durante 7 días (BonDurant, 2005).

De todas las muestras de esmegma prepucial se extrajo el ADN y posteriormente se realizó la PCR utilizando un par de cebadores TRF3/TRF4 que amplifican genes específicos del género *Tritrichomonas* siguiendo el protocolo descrito por Felleisen et al., (1998). Además, todos los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados por el servicio de MacroGen Inc. (Seúl, Corea) para confirmar que correspondían a *T. foetus*.

La metodología para detección de *T. foetus* está descrita detalladamente en el capítulo 5. Las pruebas microbiológicas y moleculares fueron realizadas en INIA La Estanzuela.

Cuestionario

El cuestionario (Anexo 1) constaba de aproximadamente 40 preguntas cerradas, siendo de tipo dicotómicas y de múltiple opción. El objetivo fue recolectar datos de los establecimientos, datos del sistema productivo, datos del manejo sanitario y reproductivo. Los datos obtenidos en el cuestionario fueron cargados en una base de datos digital en Excel 2016 (Microsoft Office®) usando formularios de Google forms® (<https://www.google.com/forms/about/>).

Análisis Estadístico

Se realizó el cálculo del “n” muestral para detectar una asociación entre *N. caninum* y aborto en un software libre RStudio® (versión 1.0.153) utilizando el paquete *epiR* y la función "*epi.cohortsize*". El tamaño de la muestra fue calculado para detectar con 80% de poder una Razón de Prevalencia (RP) mínima de aborto entre expuestos (*N. caninum* positivo) y no expuestos (*N. caninum* negativo) de 1,5. Para esto, se asumió que aproximadamente 30% de los animales seropositivos y 20% de los animales seronegativos tenían historia de aborto y un efecto de delineamiento (*deff*) de 1,75. El “n” mínimo necesario considerando un nivel de confianza de 95% fue de 1135 animales.

Los cálculos de las estimativas de prevalencias para las enfermedades (neosporosis y leptospirosis) también fueron realizadas en RStudio® utilizando el paquete *survey*; los establecimientos fueron considerados estratos y el peso muestral (inverso de la probabilidad de sortear una VO) fue incluido para el cálculo de los errores.

Los factores asociados entre seropositividad para *N. caninum* (variable dependiente) y las variables del cuestionario (variables independientes) y aborto (variable dependiente) y seropositividad para *N. caninum* y *Leptospira* (variable independiente) fueron realizadas utilizando modelos de Poisson con variancia robusta en el software SAS Studio (SAS

University Edition). El modelo estima la RP que es un indicador de los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes.

Los modelos para evaluar el efecto de la infección (seropositividad para *Leptospira* y *Neospora*) sobre la historia de aborto fueron ajustados por la edad de las vacas; además el status vacunal contra *Leptospira* y seropositividad a *N. caninum* también fueron utilizados en el modelo para evaluar el efecto de la infección por *Leptospira*. La inclusión de seropositividad a *N. caninum* en el modelo fue hecha para controlar dicho efecto ya que muchas vacas pueden presentar seropositividad para ambos agentes y el efecto de *N. caninum* puede ser un sesgo. Se consideró el punto de corte $\geq 1:400$ para determinar la asociación entre seropositividad de serovares de *Leptospira* y abortos (Sanhueza et al., 2013). Para el modelo de los factores (variables del cuestionario) sobre la seropositividad a *N. caninum* las siguientes variables fueron incluidas: número de perros, origen de los perros, sexo de los perros (macho, hembra), castrado o entero, contacto de los perros con vacas y número de VO (variable de ajuste). Todas las variables fueron incluidas y retiradas una a una hasta que solamente quedaron variables con valor de $p < 0,05$ (proceso “backward” de selección de variables).

El análisis de estadística descriptiva para determinar las frecuencias de los diagnósticos y de las variables recopiladas durante la encuesta fueron realizadas en Excel 2016 (Microsoft Office®).

RESULTADOS

Caracterización de los establecimientos

Los tambos estudiados (20) estaban localizados en 7 departamentos distintos incluyendo Colonia (7; 35%), San José (4; 20%), Canelones (3; 15%), Florida (2; 10%), Lavalleja (2; 10%), Rio Negro (1; 5%) y Soriano (1; 5%) (Fig. 1 a,b).

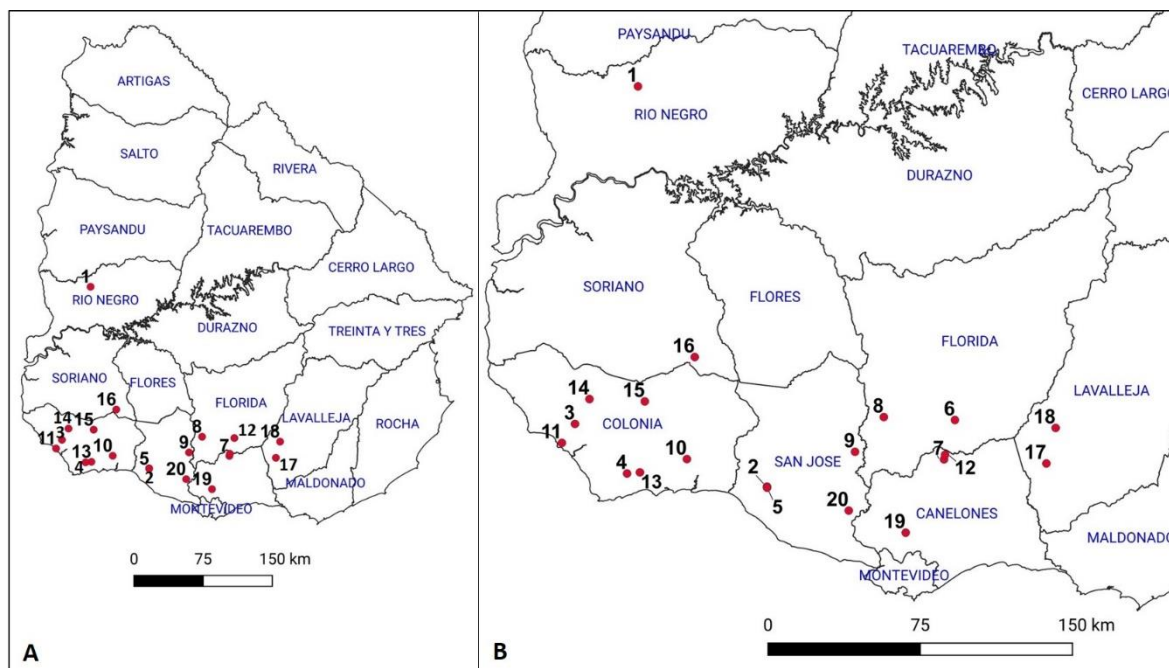


Figura 1: Mapa de Uruguay. A) Localización departamental de los establecimientos según la identificación numérica que fueron registrados los tambos (1-20). B) En destaque la región sur del país donde fueron realizados los muestreos.

La superficie de los establecimientos dedicadas a los tambos varió de 58 a 750 ha, con una mediana de 168 ha. La mediana de VO de los tambos encuestados fue de 163,5, con un mínimo de 60 y un máximo de 750 vacas de un total de 4208 vacas. Las principales razas y cruza criadas en los tambos fueron: 65% (13) Holando; 25% (5) Kiwi; 5% (1) Jersey; y 5% (1) Normando. De los 20 tambos, 3 (15%) no tenían toros en su predio, sin embargo 17 tambos criaban toros y tenían entre 1 y 120 toros.

El 30% (6) de los predios realizaban servicio continuo y en consecuencia tenían pariciones todo el año, el 45% (9) realizaban servicio semicontinuo con el objetivo de evitar la parición de verano y el 25% (5) de los establecimientos realizaban servicio estacionado con pariciones entre febrero y mayo principalmente. Las tecnologías usadas en los servicios de los establecimientos muestreados fueron: en 70% (14) usaban inseminación artificial (IA) con repaso con toro(s), en 15% (3) sólo IA y en los otros 15% (3) monta natural (Tabla 1).

De los 20 establecimientos estudiados, 30% (6) hacían diagnóstico de gestación temprana entre los días 30-35 postservicio; 30% (6) entre los días 40-45 y 35% (7) entre los días 50-60; en uno de los tambos (5%) esta pregunta no fue contestada. De estos establecimientos el diagnóstico de preñez era realizado por ecografía en 50% (10) y por tacto en 45% (9); en un tambo no hubo respuesta (5%) (Tabla 1). Todos los establecimientos que

hacían el diagnóstico de gestación temprano (entre 30-35 días) lo hacían por ecografía.

Tabla 1: Manejo reproductivo utilizado en los 20 tambos estudiados.

Manejo reproductivo	Número de tambos	Frecuencia (%)
Servicio		
<i>Estacionado</i>	5	25
<i>Semicontinuo</i>	9	45
<i>Continuo</i>	6	30
Tecnología		
<i>Inseminación artificial</i>	3	15
<i>Monta natural</i>	3	15
<i>IA; repaso con toro</i>	14	70
Período de diagnóstico de gestación (días postservicio)		
<i>30-35</i>	6	30
<i>40-45</i>	6	30
<i>50-60</i>	7	35
Como se realiza el diagnóstico gestacional		
<i>Tacto</i>	9	45
<i>Ecografía</i>	10	50

IA: inseminación artificial.

En promedio, los establecimientos reportaron que la tasa de pérdidas gestacionales entre el servicio y el diagnóstico de gestación fue de 25%, variando desde tambos con fallas en la detección de pérdidas en este período hasta pérdidas de 50%. Las pérdidas reportadas desde el diagnóstico de gestación hasta el parto estuvieron entre 2% y 27%, con una media de 10% (Fig. 2).

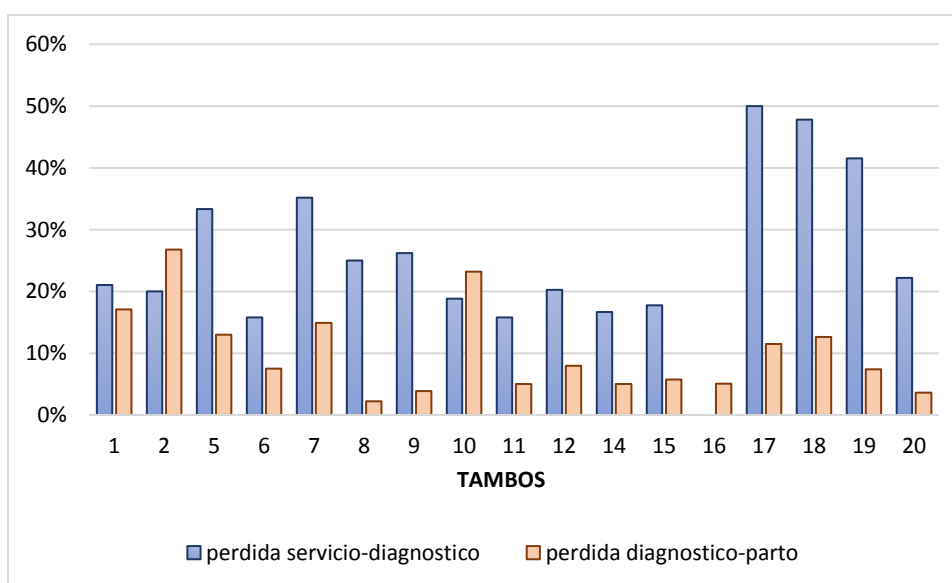


Figura 2: Porcentaje de pérdidas gestacionales tempranas (entre el servicio y el diagnóstico de gestación) y pérdidas gestacionales tardías (entre diagnóstico de gestación y el parto) en los 20 tambos estudiados.

Sobre el manejo sanitario, 17 (85%) de los tambos vacunaban contra alguna de las enfermedades abortivas, y 3 (15%) de ellos no vacunaban. De los tambos que usaban vacunas, 47% (8) utilizaban productos comerciales solamente contra leptospirosis, ya los demás 35% (6) usaban vacunas que generaban protección contra diferentes patógenos abortivos (DVB; IBR; CGB; leptospirosis; *Histophilus somni*). Además, 14 (70%) reportaron aplicar métodos de control de roedores en el establecimiento y 30% (6) no.

El 100% de los establecimientos tenía al menos 1 perro, el número medio de perros fue de 2,9, variando de 1 a 12. El 35% (7) de estos predios tenían perros nacidos en sus establecimientos. El 60% (12) de los predios tenían perros de otro origen, siendo que 25% (3) de dichos tambos compraron sus perros y 75% (9) los adoptaron. Uno de los tambos no sabía el origen del perro. Además, 13 predios (65%) que tenían perros reportaron que observaban con frecuencia que los animales comían fetos y/o placentas de vacas abortadas o paridas.

Serología para *Neospora caninum* y factores asociados

Se muestrearon para el diagnóstico serológico de *N. caninum* un total de 1200 animales que representaban 4208 vacas en ordeño ubicadas en los 20 tambos estudiados. En 100% (20/20) de los tambos se identificó al menos un animal seropositivo a *N. caninum*, observando variación de la seroprevalencia intrarodeo de 6,67% a 81,67% (Tabla 2). A nivel individual la seroprevalencia fue de 36,1% (406/1200) ($d_{eff} = 1,41$; $IC_{95\%} = 33,3\% - 38,8\%$).

Tabla 2: Seroprevalencia intrarodeo de *N. caninum* en los 20 tambos estudiados.

Tambo	N° de vacas seropositivas/muestreadas	Seroprevalencia (%)	Error Estándar (%)	IC _{95%}
1	49/60	81,67	4,77	72,3 - 91,0
2	20/60	33,33	5,28	23,0 - 43,7
3	44/60	73,33	2,88	67,7 - 79,0
4	16/60	26,67	4,46	17,9 - 35,4
5	7/60	11,67	0,00	11,7 - 11,7
6	23/60	38,33	4,78	29,0 - 47,7
7	11/60	18,33	3,19	12,1 - 24,6
8	4/60	6,67	2,83	1,1 - 12,2
9	12/60	20,00	4,56	11,1 - 28,9
10	26/60	43,33	0,00	43,3 - 43,3
11	22/60	36,67	2,03	32,7 - 40,6
12	18/60	30,00	4,85	20,5 - 39,5
13	26/60	43,33	5,69	32,2 - 54,5
14	20/60	33,33	4,14	25,2 - 41,4
15	26/60	43,33	4,89	33,7 - 52,9
16	12/60	20,00	4,99	10,2 - 29,8
17	13/60	21,67	2,73	16,3 - 27,0
18	32/60	53,33	5,73	42,1 - 64,6
19	12/60	20,00	4,29	11,6 - 28,4
20	13/60	21,67	4,68	12,5 - 30,8

IC: intervalo de confianza.

Del total de 1200 vacas fue posible obtener la información del status de aborto de 950 vacas, de las que 857 (90,2%) tenían el registro de no abortada y 93 (9,8%) de abortadas (aborto visto). De la misma forma, fue posible registrar información sobre la edad en 930 de estos animales, la media de edad fue de 4 años. La seropositividad a *N. caninum* y el número total de vacas abortadas según la edad en años de las vacas muestreadas se expresan en la Figura 3.

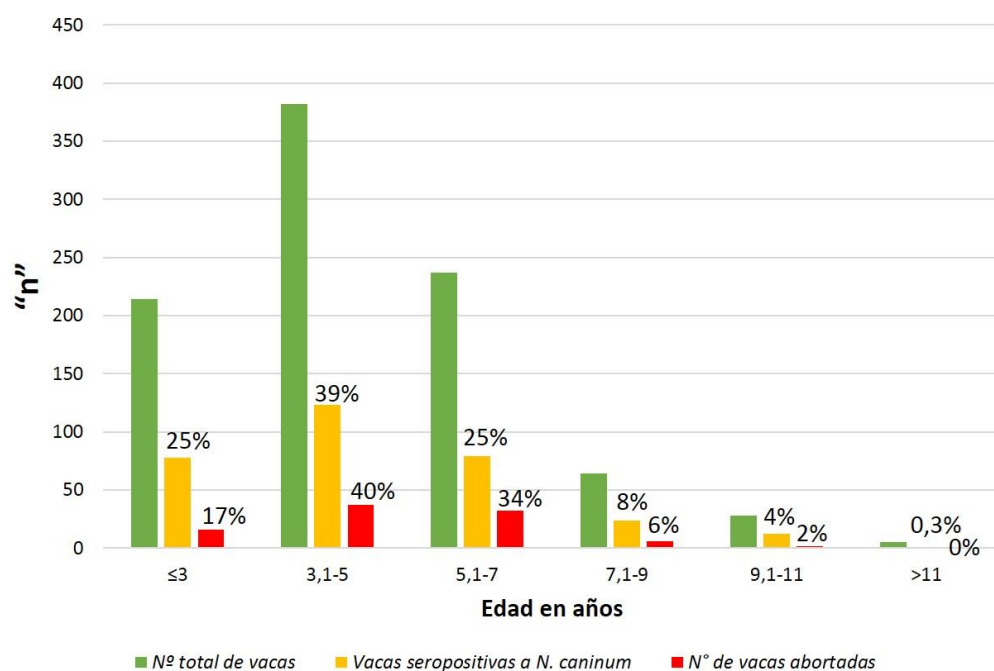


Figura 3: Número total de vacas en ordeño (n=930) y frecuencia de vacas seropositivas a *N. caninum* (n=317) y abortadas (n=93) según el rango de edad en años.

La frecuencia de vacas seropositivas a *N. caninum* en el grupo de animales con registro del status de abortos fue de 34,21% (325/950). Del total de 325 animales positivos a *N. caninum*, 58 (17,85%) eran vacas que abortaron y 267 (82,15%) que no abortaron (Figura 4). El total de animales seronegativos fue de 65,79% (625/950), de ellos 35 (5,6%) tenían registro de aborto y 590 (94,4%) no (Tabla 3).

La prevalencia de abortos en vacas seropositivas a *N. caninum* fue 3,4 veces la prevalencia de abortos en vacas seronegativas a *N. caninum* ($p < 0,0001$; $RP = 3,4$; $IC_{95\%} = 1,86 - 6,24$).

Tabla 3: Prevalencias de abortos en vacas seropositivas y seronegativas a *N. caninum*.

Serología para <i>N. caninum</i>	Abortos		Total	Prevalencia de abortos
	Si	No		
Seropositivo	58	267	325	17,85%
Seronegativo	35	590	625	5,6%
Total	93	857	950	9,8%

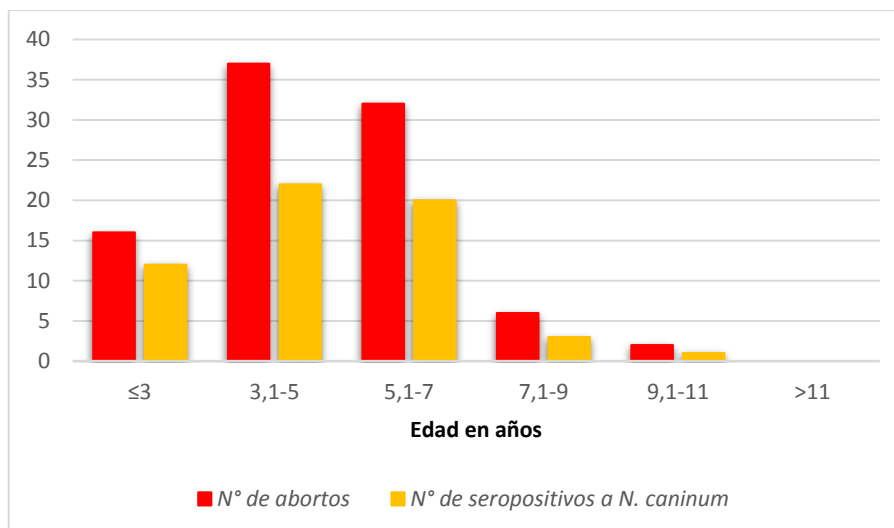


Figura 4: Número de vacas en ordeño abortadas (n=93) y seropositividad a *N. caninum* (n=58) según la edad en años.

Hubo asociación estadísticamente significativa ($p= 0,001$) entre la seropositividad a *N. caninum* y el origen de los perros en los establecimientos en el modelo final. Se observó que la prevalencia de *N. caninum* en vacas de tambos con perros nacidos en el establecimiento fue 2,03 veces la prevalencia de *N. caninum* en vacas de establecimientos que tenían perros adoptados (variable de referencia). No hubo diferencia entre la prevalencia de *N. caninum* entre vacas de establecimientos que tenían perros comprados en comparación con los adoptados (Tabla 4).

Tabla 4. Razón de prevalencia del origen de los perros en los tambos en asociación con la seropositividad de *N. caninum*.

Origen de los perros	Razón de Prevalencia	IC _{95%}	p valor
Nacidos en el tambo	2,03	1,33 – 3,10	p= 0,001
Comprados	1,09	0,65 – 1,85	p= 0,7383
Adoptados (referencia)	1	1	

IC: intervalo de confianza.

Serología para *Leptospira* spp.

De las 1200 muestras de suero sanguíneo de VO, 500 fueron sometidas a serología por MAT para 7 serovares distintas de *Leptospira* spp. De estas, 97 (19,4%) fueron seroreactivas a al menos a uno de los serovares. El serovar más prevalente fue Pomona con 24,7%, seguido del serovar Hardjoprajitno (10,9%), Hardjobovis (9,5%), Wolfii (7,1%),

Canicola (2,9%), Grippytyphosa (1,4%) y por último el serovar Icterohaemorrhagiae (0,7%) (Tabla 5).

Tabla 5: Seroprevalencia a nivel individual de las 7 serovares de *Leptospira* spp.

Serovares	Prevalencia	Deff	IC _{95%}	
Grippytyphosa	1,4%	2,83	0,5%	4,0%
Icterohaemorrhagiae	0,7%	4,85	0,1%	5,0%
Canicola	2,9%	3,47	1,3%	6,0%
Pomona	24,7%	1,46	21,1%	29,0%
Hardjobovis	9,5%	2,63	6,5%	14,0%
Hardjoprajitno	10,9%	2,36	7,8%	15,0%
Wolfii	7,1%	2,61	4,5%	11,0%

Deff: efecto del delineamiento, IC: intervalo de confianza.

A nivel de rodeos, 16 de los 20 tambos (80%) presentaron animales seropositivos a uno o más de los serovares mencionados arriba. La variación intrarodeo y los serovares detectados en cada tambo se expresan en la figura 5.

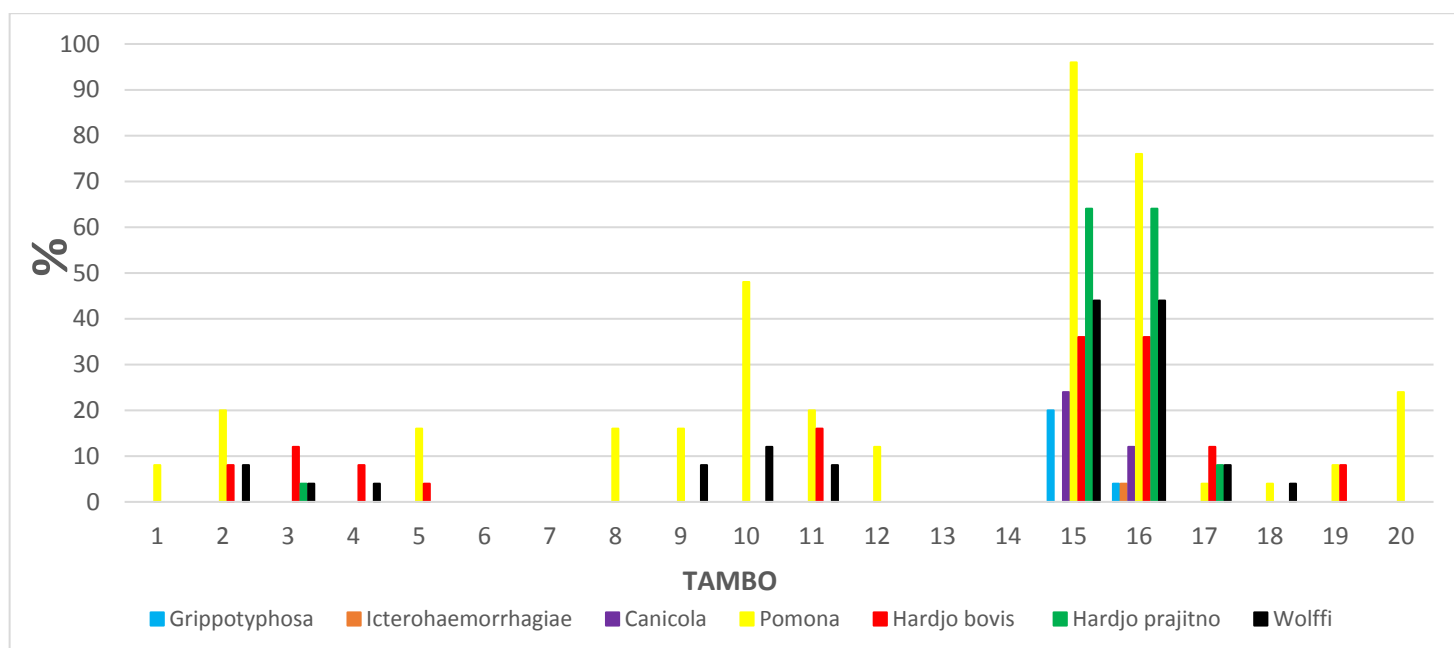


Figura 5: Prevalencia intrarodeo de 7 serovares de *Leptospira*.

Del total de 500 vacas muestreadas 393 (78,6%) tenían el registro del status de abortos, de esas 43 (11%) eran vacas abortadas. De las vacas abortadas, 12 (30%) tuvieron títulos $\geq 1:200$ para al menos una de los serovares estudiados. Sin embargo, no se observaron asociaciones estadísticas entre aborto y seropositividad para los serovares estudiados.

DetECCIÓN DEL vDVB

De los 1138 sueros sanguíneos de las vaquillonas ubicadas en los 20 establecimientos estudiados, la qPCR para vDVB reveló que 4 (0,35%) fueron positivos, sugiriendo una infección transitoria o un animal persistentemente infectado (PI). A nivel predial la frecuencia observada fue de 10% (2/20). El subtipo observado en las 4 muestras positivas fue el BVDV – 1a.

DETECCIÓN DE *C. fetus venerealis* Y *T. foetus*

En total se muestrearon 63 toros distribuidos en 11 de los 20 tambos. Las razas predominantes fueron Holando en 49,2% (31/63) de los animales, con la misma frecuencia la raza Normando (49,2%) y más raramente la raza Aberdeen Angus con 1,5% (1/63). La media de edad fue de 3 años, con un mínimo de 1,2 y un máximo de 6 años.

Ninguna de las 63 muestras fue positiva por cultivo, IFD y PCR para *C. fetus venerealis*. Sin embargo, 4 toros fueron positivos a *C. fetus fetus* por PCR en 4 establecimientos distintos, dicha subespecie es de importancia clínica por ocasionar abortos en bovinos, pero no es la responsable por la campilobacteriosis genital bovina (Tabla 7).

La PCR reveló que el 9,5% (6/63) de los toros analizados fueron positivos para *T. foetus* (Tabla 7). Todos ellos pertenecientes al mismo establecimiento (tambo 11), resultando una frecuencia predial de 9% (1/11) para este agente. Los 6 toros positivos a *T. foetus* eran de la raza Normando y tenían entre 1,5 y 3,5 años, en esos animales fueron realizados 3 muestreos con intervalos entre 7-10 días y todos fueron positivos en el último muestreo. En la secuenciación genética, todas las muestras positivas a PCR fueron evaluadas y tuvieron 100% de similitud con *T. foetus*.

Tabla 6: Detección de *C. fetus fetus* y *T. foetus* por PCR en esmegma prepucial de toros en 11 tambos que tenían los animales disponibles para la realización de los muestreos.

Tambo	N° total de toros en el establecimiento	N° de toros muestreados	N° de muestreos	Detección de <i>C. fetus fetus</i>	Detección de <i>C. fetus venerealis</i>	Detección de <i>T. foetus</i>
2	2	2	3	Negativo	Negativo	Negativo
6	1	1	3	Positivo	Negativo	Negativo
7	1	1	3	Positivo	Negativo	Negativo
8	6	1	3	Positivo	Negativo	Negativo
9	9	7	3	Positivo	Negativo	Negativo
10	1	1	3	Negativo	Negativo	Negativo
11	31	31	3	Negativo	Negativo	Positivo
15	1	1	3	Negativo	Negativo	Negativo
16	120	15	3	Negativo	Negativo	Negativo
17	1	1	1	Negativo	Negativo	Negativo
18	2	2	1	Negativo	Negativo	Negativo

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las pérdidas gestacionales son un de los principales factores que afectan directamente el crecimiento de los rodeos bovinos (Gädicke & Montib, 2008). En este estudio fue posible observar que las tasas de pérdidas de gestación oscilaron en ambas fases (entre el servicio y el diagnóstico de gestación, y entre éste y el parto). En promedio las pérdidas fueron de 25% entre el servicio y el diagnóstico de preñez, llegando hasta pérdidas de 50% en esta fase.

Se sabe que las fallas reproductivas, independientemente de la causa, se concentran mayormente en la fase embrionaria de la gestación (de la fertilización hasta los 45 días de gestación) (Walsh et al., 2011). Se estima que, entre 20% y 45% de las pérdidas gestacionales están concentradas en la fase embrionaria temprana (hasta el día 24 pos-fertilización) y valores entre 8% y 17,5% en la fase embrionaria tardía (del día 25 hasta el día 45 de gestación) (Humblot, 2001). Sin embargo, valores $\geq 20\%$ entre el día 14 y 45 postservicio son considerados elevados (BonDurant, 2007), ya que la cuantificación de dichas pérdidas es dificultosa debido a que la preñez no puede ser identificada rutinariamente antes del día 27 postservicio.

Un manejo adecuado observado en el estudio fue que en 50% de los tambos el diagnóstico de gestación era realizado por ecografía y la confirmación de la preñez pudo ser observada entre los días 30-35 postservicio. Según Côtéaux et al., (2010) el empleo de la ecografía puede mejorar la fertilidad en los rodeos, debido a detección temprana de las fallas y eventuales problemas.

Ya en la etapa fetal, que va del día 45 hasta el parto (Campero et al., 2017), se observó en la población de este estudio un promedio de 10% de pérdidas fetales variando de 2% a 27% entre los tambos. Valores que no se alejan de los reportados previamente en Uruguay en un estudio realizado en 10 tambos que estimó que en promedio 14% de las hembras gestantes abortan (Dr. Carlos Lemaire -Ejercicio liberal-, comunicación oral). Aunque se reportan valores aceptables de pérdidas esporádicas de gestación (abortos) que varían de 0,3% a 5% a nivel de rodeos (Givens & Marley, 2008; Humblot, 2001; Walsh et al., 2011), el aborto siempre es un resultado de un incidente (infeccioso o no), al menos un único aborto visto ya debe ser interpretado como un problema de rodeo y debe motivar una investigación diagnóstica y epidemiológica en el predio.

Aunque en 2017 los productos lácteos alcanzaron el 4º lugar en el volumen de exportaciones del Uruguay y eso significó gran impacto en la economía del país (DIEA,

2018), aún se desconocen las tasas y el monto a nivel nacional de las pérdidas reproductivas bovinas y cuánto las mismas influyen negativamente en la productividad de los rodeos y consecuentemente la rentabilidad de los productores lecheros uruguayos.

Este trabajo demostró que, al menos en esta población de la región sur de Uruguay, la neosporosis es una enfermedad prevalente en bovinos de leche, con 100% de los tambos estudiados y más de 36% de vacas seropositivas a *N. caninum*. Esta seroprevalencia fue más alta que la observada en un reciente estudio nacional que reportó 21,5% y 96% a nivel individual y predial respectivamente (Macchi, 2019). Esta diferencia, puede ser justificada por tratarse de dos estudios diferentes, donde uno demuestra la seroprevalencia a nivel nacional desde un muestreo aleatorio y el otro un muestreo por conveniencia en tambos que reportaban tener problemas de abortos. Sin embargo, los resultados observados están dentro del rango del 14,1% al 88% reportado en bovinos de leche en países de América del Sur (Moore, 2005) y también del mundo donde en media la seroprevalencia de *N. caninum* en ganado lechero es 16,1% (variación de 3,8% a 89,2%) (Reichel et al., 2013).

Para la determinación de la prevalencia de *N. caninum* en este trabajo, se realizó el diagnóstico de la exposición al protozooario usando un kit comercial de ELISA que detecta anticuerpos anti-*N. caninum* en suero sanguíneo. Las pruebas de ELISA demuestran un alto rendimiento en términos de sensibilidad y especificidad y son bien aplicadas cuando el objetivo es obtener un diagnóstico serológico poblacional en bovinos (Alvarez-García et al., 2013).

Además de la eficaz aplicabilidad de la técnica de ELISA para la aproximación diagnóstica del aborto bovino demostrada en este trabajo (ver capítulo 3) y también reportadas por otros autores (Wapenaar et al., 2007; Alvarez-García et al., 2013; Roelandt et al., 2015), la misma representa una herramienta útil a nivel de rodeo. Dicha prueba permite la detección de animales positivos al agente lo que ayudaría a implementar medidas de control en el predio (sacrificio de vacas positivas) y prevención de la neosporosis bovina. Por ejemplo, aplicandola en cuarentenas para la determinación del ingreso de animales negativos en el predio; seleccionando para el servicio vaquillonas hijas de madres negativas; y también utilizando semen de toros para carne en vacas positivas a *N. caninum* con el objetivo del nacimiento de terneros de carne para ser comercializados para faena.

La neosporosis bovina es un importante problema reproductivo y consecuentemente productivo en el mundo (Dubey & Schares, 2011), incluyendo al Uruguay (Kashiwazaki et al., 2004). Se reportan valores de riesgo de abortos en vacas y vaquillonas positivas a *N. caninum* que varían entre 2 a 26 veces más alto que en las serológicamente negativas (Lopez-

Gatius et al., 2004; Weston et al., 2005). Datos muy semejantes a los observados en esta tesis, donde en el estudio poblacional de 1200 vacas en ordeño, se observó que la prevalencia de abortos en el grupo de vacas positivas a *N. caninum* fue 2,4 mayor a la prevalencia de abortos reportados en vacas negativas. De la misma forma en un estudio de casos y controles (ver capítulo 3) las vacas seropositivas a *N. caninum* tuvieron entre 5,13 y 36 veces más chances de tener una historia reciente de aborto que los seronegativos a este agente.

Un estudio que revisa trabajos de América del Sur demostró que en los bovinos de leche hay varios factores de riesgo relacionados con la infección por *N. caninum* (Moore, 2005). La presencia de perros en los establecimientos es un importante factor de riesgo para la neosporosis bovina (Paré et al., 1998; Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999; Old-Amrouche et al., 1999; Dijkstra et al., 2002; Otranto et al., 2003; Schares et al., 2004; Fávero et al., 2017). Los mismos tienen un rol importante en la transmisión horizontal del parásito para los bovinos, que pueden resultar en brotes epidémicos de la enfermedad en los rodeos (McAllister et al., 2000). Gondim et al., (2000) afirman que los cánidos eliminan hasta 504400 ooquistes de *N. caninum* en las heces y que solamente 300 de estos son suficientes para causar infección en terneros.

En base a esto, el presente estudio deja en evidencia un factor importante asociado a la seropositividad a *N. caninum*. Se pudo determinar referente al origen de los perros que, cuando estos habían nacido en los establecimientos, *N. caninum* fue 2,03 veces más prevalente en los rodeos en comparación con tambos que tenían perros adoptados o comprados. Lo que complementa un reciente estudio en el país, que reportó que el número de perros en los predios lecheros está asociado a altos niveles de infección. Por cada perro adicional en el predio existe un riesgo de 1,43 veces mayor de tener seroprevalencias superiores a 20% (Macchi, 2019). Estos factores, llevados a las condiciones productivas de manejo extensivo de los bovinos en los tambos de Uruguay, podrían tener un impacto negativo en la reproducción de los bovinos y en la economía del sector lácteo, teniendo en cuenta la gran difusión de la enfermedad en el país y la sobrepoblación de perros existentes.

En este estudio evaluamos serológica y epidemiológicamente la infección por 7 serovares distintos de *Leptospira* en suero sanguíneo de 500 vacas en ordeño ubicadas en 20 tambos localizados en la región sur del Uruguay. La prevalencia fue de 19,4% de los animales con títulos $\geq 1:200$ y con al menos una vaca seroreactiva en 80% de los predios. Sorprendentemente muy semejante a los valores actualmente estimados para bovinos de leche a nivel nacional, donde la seroprevalencia fue de 18,4% y 83,5% a nivel individual y predial respectivamente (Dr. Federico Fernández, MGAP, comunicación personal 2018).

Dichas prevalencias son similares a las encontradas en el estado de Rio Grande del Sur, Brasil, que determinó valores de 79,3% de los establecimientos y 28,9% (709/2451) de los bovinos seropositivos a *Leptospira* spp. (Fávero et al., 2001), donde las condiciones geoclimáticas y de manejo del ganado son similares a las de Uruguay.

Los últimos antecedentes en Uruguay para bovinos de carne demostraron que 38,5% (2410/6261) tenían anticuerpos contra *Leptospira* spp., siendo mayormente observada una frecuencia de anticuerpos para los serovares Hardjo y Wolfii seguidos del Pomona (Repiso et al., 2005). Sin embargo, se pudo observar en este estudio que el serovar más prevalente en vacas en ordeño fue Pomona con 24,7%, seguido del serovar Hardjoprajitno (10,9%), Hardjobovis (9,5%), Wolfii (7,1%), Canicola (2,9%), Grippytyphosa (1,4%) e Icterohaemorrhagiae (0,7%).

Los cerdos son considerados huéspedes de mantenimiento de diferentes serogrupos de *Leptospira*, entre ellos el serogrupo Pomona. Estos animales también son capaces de diseminar la infección entre los bovinos (Ellis, 2015). En Uruguay la cría intensiva de cerdos domésticos es de baja escala, no siendo frecuente la práctica de esta actividad en tambos en el país y tampoco en los tambos utilizados en este estudio (sólo 1 de los 20 establecimientos estudiados tenía cerdos). Esto sugiere que la elevada prevalencia puede estar asociada a dos factores: el contacto con animales de vida libre como los jabalíes (*Sus scrofa*) y los zorrillos (*Mephitidae*) que también actúan como reservorios de este serovar y están presentes en Uruguay (Suepaul et al., 2011; Ellis, 2015); o por la presencia de anticuerpos vacunales (Martins et al., 2018).

Se determinó que, después de Pomona, el segundo y el tercero de los serovares más prevalentes en este estudio fueron el Hardjoprajitno y el Hardjobovis, respectivamente. Para el serovar Hardjo el bovino está reportado como huésped de mantenimiento, generalmente, la infección es subclínica, excepto en vacas en lactación donde puede ocasionar baja de la producción de leche (Ellis, 2015). Está ampliamente documentado que el serovar que frecuentemente ocasiona episodios de abortos, natimortos y mortalidad de terneros es el serovar Pomona (Ellis, 1994; Draghi et al., 2011), sin embargo, hay evidencias de que el serovar Hardjo también está asociado con fallas reproductivas en bovinos de algunos países como Argentina (Cantón et al., 2006), Brasil (Junqueira et al., 2006), Nueva Zelandia (Sanhueza et al., 2013) e India (Balamurugan et al., 2018).

Aunque en Uruguay, hay antecedentes de pérdidas gestacionales en bovinos por *Leptospira* spp. (Easton, 2006), en un reciente estudio en 102 fetos y placentas de bovinos lecheros abortados no se identificó *Leptospira* spp. como agente causal de abortos, a pesar

de que se identificó mediante PCR, ADN de este agente en un feto abortado que no presentaba lesiones (Mácias-Rioseco, 2019). En la población estudiada en esta tesis no se observaron asociaciones estadísticas entre vacas abortadas y seropositividad a ninguno de los serovares utilizados. Igualmente, estudios epidemiológicos más amplios, incluyendo estudios de brotes por esta enfermedad en asociación con pérdidas gestacionales en ganado lechero y de carne deberían ser realizados en el país, debido que los sueros sanguíneos de las vacas muestreadas en este estudio no fueron enfrentados con todos los antígenos provenientes de cepas autóctonas aisladas en el Uruguay.

Para determinar la seroprevalencia de *Leptospira* en este trabajo, se utilizó la serología por MAT, un método laboratorial de diagnóstico serológico útil para determinar títulos de anticuerpos a nivel de rodeos (Ellis, 2015) y no como diagnóstico individual. Para este último están los métodos basados en la PCR (Otake et al., 2012).

Los requisitos mínimos para el desarrollo confiable de la técnica MAT es que el laboratorio debe tener cepas representativas de todos los serogrupos conocidos en el país y/o en la región, de la misma forma se debe tener las cepas reportadas como de mantenimiento de las especies a ser examinadas (Ellis, 2015). Importantes estudios acerca de *Leptospira* spp. en animales, y más específicamente en rumiantes, se han realizado recientemente en Uruguay, y algunos otros están siendo conducidos actualmente. El país cuenta con un banco de 40 cepas autóctonas aisladas, y la MAT ya viene siendo aplicada en base a ese banco de antígenos (Zarantonelli et al., 2018). De la misma forma, una PCR que amplifica el gen *lipL32*, que es una lipoproteína de membrana presente en las *Leptospiras* patogénicas y de patogenicidad intermedia (Picardeau, 2017), se ha estandarizado en el país (Zarantonelli et al., 2018) para el uso en la rutina diagnóstica cuando se hace necesaria la confirmación molecular de infecciones por este agente en diferentes especies.

La interpretación de los resultados de la serología obtenidos con la técnica de MAT debe ser cuidadosa. Debido que no es posible diferenciar los títulos vacunales de los causados por una exposición natural a *Leptospira* spp. La dinámica de la respuesta inmune postvacunación aún no está totalmente clara (Grassmann et al., 2017), particularmente en los animales (Martins et al., 2018).

En general, se requieren 10-15 días para alcanzar títulos de anticuerpos específicos detectables en la circulación después de la vacunación (Zuerner, 2015), un período similar al determinado para infecciones naturales en bovinos (Ellis, 2015). Trabajos realizados en Brasil, determinaron que la vacunación induce una respuesta humoral específica observada por el aumento de la producción de anticuerpos contra todos los serogrupos presentes en

vacunas comerciales disponibles en ese país, con un pico en el día 60 postvacunación y disminución progresiva hasta el día 120 (Martins et al., 2018) pudiendo aún ser detectado hasta 6 meses después de la vacunación principalmente contra *Leptospiras* del serogrupo Sejroe (Arduino et al., 2009).

Se reporta que una titulación de 1:50 por la prueba MAT indica la exposición del animal al agente, y que títulos $\geq 1:100$ ya son indicadores de la enfermedad (Plank & Dean, 2000). Zuerner et al., (2011) demostraron que los anticuerpos vacunales, principalmente contra el serovar Hardjo alcanzan títulos entre 1:400 y 1:500 por la prueba MAT en la semana 6 postvacunación. Debido a eso, para verificar una posible asociación del aborto con la seropositividad a los 7 distintos serovares de *Leptospira* en este estudio, se utilizó el punto de corte de $\geq 1:400$, sabiendo que la mayoría de los tambos incluidos en el estudio administraban vacunas comerciales contra *Leptospira* spp.

Los antecedentes de prevalencia del vDVB en Uruguay se basan en estudios de detección de anticuerpos contra el virus y sugieren una alta exposición al agente en el país. Un trabajo a nivel nacional en ganado de carne indicó que 69% de 6358 bovinos eran seropositivos, y que el 100% de 230 rodeos tenían al menos un animal seropositivo (Guarino et al., 2008). Más recientemente en ganado de leche, se determinó que 80,9% de 1438 bovinos fueron seropositivos en 98,8% de 102 tambos evaluados (Dr. Federico Fernández, MGAP, comunicación personal 2018).

El objetivo de este estudio fue identificar la infección activa por el vDVB a través de detección del genoma viral en suero de bovinos lecheros. Se pudo detectar por qPCR la infección en 4 (0,35%) de 1138 vaquillonas que estaban en 2 (10%) de los 20 predios evaluados. Maya et al., (2016) determinaron que 4,1% (16/390) de las muestras de suero bovino provenientes de 14 rodeos diferentes, dedicados en su mayoría a producción de bovinos de carne en Uruguay fueron positivos al vDVB usando pruebas moleculares para detección del genoma viral. Ambos estudios sugieren que los animales positivos podrían tratarse de bovinos PI o de una infección aguda transitoria adquirida en la etapa postnatal, o, más probablemente, una combinación de ambas situaciones.

La literatura determina que la prevalencia de bovinos PI en un rodeo es $<10\%$, generalmente están entre el 0,1-1% (Bolin et al., 1985), sin embargo, ésta puede ser tan alta como 25-30% en rodeos en los que grandes cantidades de vacas o vaquillonas han sido expuestas a cepas no citopáticas del vDVB durante la gestación temprana (Uzal et al., 2016). Aunque los bovinos expuestos al virus en el útero constituyen una porción importante de presentaciones clínicas, los casos de infección aguda posnatal no deben ser desconsiderados

como una fuente importante de pérdidas directas causadas por el vDVB (Ridpath et al., 2010).

Los bovinos PI son virémicos y excretan el virus de por vida, y son inmunotolerantes a la cepa no citopática con la que están infectados, debido a una incapacidad del sistema inmune de reconocer a los antígenos virales y, consecuentemente, no producen anticuerpos contra el virus, no siendo posible el diagnóstico de exposición al mismo por serología (Brodersen, 2014; Uzal et al., 2016). Contrariamente a las pruebas serológicas, las técnicas diagnósticas basadas en detección del antígeno viral (ELISA) y las pruebas moleculares, como la qPCR utilizada en este estudio, son eficaces para la detección de animales PI *in vivo* a partir de un muestreo de suero sanguíneo pareado (Kim & Dubovi, 2003). En nuestro estudio no fue posible realizar muestreos pareados de los animales infectados, motivo por el cual no pudimos discriminar entre infecciones persistentes y transitorias.

Los resultados obtenidos en este estudio deberían estimular a los investigadores, veterinarios y productores lecheros del país a implementar estrategias de diagnóstico de situación en los rodeos uruguayos. La identificación de animales PI es fundamental para el control de la diarrea viral bovina. Un importante factor de riesgo para la infección por el vDVB en los rodeos es la comercialización e introducción de bovinos sin control previo del estatus de infección viral, factor que está relacionado directamente con la adquisición de animales PI que pueden introducir la infección en los rodeos (Solis-Calderon et al., 2005; Luzzago et al., 2008; Talafha et al., 2009; Saa et al., 2012).

Las enfermedades venéreas, como la campilobacteriosis genital bovina y la tricomoniasis tienen un importante rol debido a las pérdidas que producen por ocasionar bajas tasas de preñez, repetición de servicios y preñeces tardías (Campero et al., 2017). En este trabajo no fue posible diagnosticar *C. fetus venerealis* en las muestras prepuciales de los 63 toros utilizados para la reproducción en 11 de los 20 tambos utilizados (ver discusión de las pruebas diagnósticas en el capítulo 2). Sin embargo, este estudio, que resulta de un número pequeño de rodeos y toros lecheros, no minimiza la importancia que la enfermedad podría tener en tambos del país, ya que la campilobacteriosis genital bovina viene siendo reportada hace más de 4 décadas en Uruguay (Stella & Canabez, 1971; Repiso et al., 2005; Delpiazzo et al., 2019), siendo una reconocida etiología de abortos en bovinos de carne (Bove et al., 2013) y leche (Easton, 2006; Macías-Rioseco, 2019).

Tritrichomonas foetus fue detectado por PCR en esmegma prepucial de 6 de 63 toros (9,5%) del mismo establecimiento, aunque no se logró cultivar el agente. Los toros infectados dentro de un único rodeo pueden variar según la edad pudiendo llegar hasta 40%

aunque la media suele ser de 10-20% (Campero et al., 2017). En Uruguay no hay reportes recientes de evidencia de infección por *T. foetus* en bovinos. La prueba diagnóstica más utilizada en el país es el cultivo en estufa a 37°C y visualización directa del protozoario en microscopio. Dicha prueba es también muy utilizada en la región (Campero et al., 2017) y en el mundo (Clark & Diamond, 2002; Schonmann et al., 1994).

Como se mencionó arriba, no fue posible aislar *T. foetus*, incluso con la realización de muestreos repetidos por 3 veces con un intervalo entre 7-10 días, como recomienda la literatura para optimizar los resultados de dicha prueba (Terzolo et al., 1992; Campero et al., 2017), dada su baja sensibilidad (72%), principalmente sobre muestras prepuciales de toros (Pérez et al., 2006; Yao, 2013). Otro motivo por el cual se recomienda realizar muestreos seriados en toros con reposo sexual es que la monta hace disminuir la población de *T. foetus* en el prepucio de los toros dificultando su recuperación y posterior aislamiento (Campero et al., 2017).

Debido a diversos factores que promueven una sensibilidad relativamente baja para el cultivo (Yao, 2013) y al alto costo de un resultado falso negativo o positivo a *T. foetus*, se utilizó simultáneamente la PCR como prueba diagnóstica complementaria para aumentar la probabilidad de identificar la mayor cantidad de verdaderos positivos en este muestreo, e incluso animales que podrían estar recientemente infectados. La PCR convencional tiene una sensibilidad y especificidad de 78-98% y 93-96%, respectivamente, más altas que el cultivo (Ho et al., 1994; Mukhufhi et al., 2003; Mutto et al., 2006; Cobo et al., 2007) y también permite detectar una baja cantidad de *T. foetus* en las muestras (2 parásitos/mL) (Mukhufhi et al., 2003).

La PCR podría ser utilizada por los laboratorios como prueba diagnóstica para la detección de *T. foetus* en conjunto con el cultivo (Felleisen et al., 1998; Mukhufhi et al., 2003; Cobo et al., 2007), en pos de lograr una mayor sensibilidad y especificidad y consecuentemente resultados más confiables. En nuestro estudio solamente pudimos detectar el parásito debido al empleo de la PCR, lo que sugiere que la utilización del cultivo como única técnica podría estar resultando en sub-detección de la infección por *T. foetus* en toros.

Una vez que las pruebas diagnósticas para las diferentes enfermedades infecciosas que causan pérdidas embrionarias o fetales en bovinos estén diseminadas y estandarizadas por los laboratorios veterinarios en Uruguay, estudios epidemiológicos en asociaciones con las tasas reproductivas y la cuantificación de las pérdidas económicas se hacen necesarias en

el país. Esta información permitirá tomar medidas adecuadas para el control de estas enfermedades en el sector lácteo.

7. CAPÍTULO 2: DIAGNÓSTICO DE LA CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA EN AMÉRICA DEL SUR

RESUMEN

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad infecciosa venérea que afecta la reproducción. Es causada por un bacilo Gram negativo *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* (*Cfv*), que puede incluir el biotipo *intermedius*. El toro es el portador y diseminador asintomático de la enfermedad. En las hembras, *Cfv* puede causar infertilidad y aborto esporádico. El objetivo de este estudio fue revisar y discutir métodos para el diagnóstico de la CGB, su prevalencia e impacto económico en América del Sur. La CGB es una enfermedad de distribución mundial y llega a causar una disminución de la tasa de preñez del 15 al 25%. La prevalencia de la CGB en diferentes regiones de los países sudamericanos muestra una variación entre 2.3 y 100%. Las discrepancias posiblemente dependen de las diferencias en las prácticas sanitarias, de manejo y reproductivas entre predios y regiones, pero también en la interpretación de diferentes pruebas de diagnóstico. Las pruebas de laboratorio conocidas actualmente incluyen el cultivo bacteriano, inmunofluorescencia directa, ensayos inmunoenzimáticos, prueba de aglutinación de muco vaginal, métodos basados en PCR, histología e inmunohistoquímica, que se aplican e interpretan en laboratorios de diagnóstico a diferentes escalas. Los datos epidemiológicos de la CGB en América del Sur deben interpretarse con precaución. Se ha informado una alta prevalencia en algunos estudios, aunque la baja especificidad de las pruebas de diagnóstico utilizadas podría conducir a una sobreestimación de los resultados.

Palabras clave: Campilobacteriosis genital bovina, infertilidad, abortos, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, métodos de diagnóstico, América del Sur.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reproductivas de los bovinos que resultan en infertilidad y aborto causan pérdidas económicas significativas (Weersink et al., 2002). En promedio, solo se puede identificar una causa específica en aproximadamente 45% de los fetos bovinos abortados examinados en laboratorios de diagnóstico veterinario en América del Sur. La proporción de casos de aborto atribuidos a *Campylobacter* spp. varía de 0 a 13% de todos los fetos con una etiología confirmada (Campero, 2000; Campero et al., 2003; Easton, 2006; Fernandez et al., 2007; Antoniassi et al., 2013). Valores similares se encuentran en otros países, como los E.E.U.U., donde se alcanza un diagnóstico confirmado en el 35.25% de los casos, y *Campylobacter* spp. representa el 1.8-10.6% de los casos con diagnóstico etiológico (Anderson, 2007).

Las enfermedades venéreas, como la campilobacteriosis genital bovina (CGB) causada por el *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* (*Cfv*) (OIE, 2017), son causas importantes de pérdidas reproductivas. *Campylobacter fetus* es un bacilo Gram negativo

curvo, móvil, no formador de esporos, con uno o dos flagelos polares. La especie comprende la subespecie *Cfv*, que puede incluir el biotipo *intermedius* (Eaglesome & Garcia, 1992; Van Bergen et al., 2005) y la subespecie *Campylobacter fetus* subs. *fetus* (*Cff*) y *C. fetus* subs. *testudinum* (*Cft*) (Fitzgerald et al., 2014). *Campylobacter fetus fetus* es un residente común del intestino de los mamíferos y puede causar abortos en bovinos y ovinos (Véron & Chatelain, 1973), así como enfermedades entéricas o sistémicas en humanos (Wagenaar et al., 2014). La transmisión de *Cff* ocurre principalmente a través de la ruta fecal-oral; Esto es seguido por una bacteremia transitoria durante la cual, en rumiantes preñados, el agente puede translocarse a la placenta, lo que resulta en placentitis y aborto (Schlafer & Chatelain, 2016). *Campylobacter fetus testudinum* no es clínicamente importante para los bovinos, se reporta la infección en reptiles y también ha sido aislado de humanos (Fitzgerald et al., 2014).

La CGB se reconoció por primera vez como una causa de infertilidad en los bovinos en la década de 1940 y alcanzó distribución mundial en la década de 1960 (Clark, 1971). En América del Sur se diagnosticó por primera vez en 1955 en Brasil, a través del aislamiento de la bacteria de un feto bovino abortado (Dápice, 1956). La CGB es una causa importante de fallas reproductivas, infertilidad y celo irregular tanto en vaquillonas como en vacas, aunque las vaquillonas son más susceptibles a la infección debido a los bajos niveles de inmunidad (Stoessel, 1982; Catena et al., 2003; Jimenez et al., 2011).

Los rebaños con infección endémica por *Cfv* tienen una eficiencia reproductiva reducida, incluyendo tasas de preñez más bajas de lo esperado, pérdidas embrionarias, abortos esporádicos, mayor número de servicios hasta la concepción, largos períodos de partos y un intervalo más largo entre partos. Los abortos se detectan con mayor frecuencia entre los 4 y 6 meses de gestación (Clark, 1971; Pellegrin et al., 2002; BonDurant, 2005; Campero et al., 2005; Morrell et al., 2011).

La tasa promedio de preñez en rebaños infectados varía según la proporción relativa de portadores, hembras en edad reproductiva susceptibles e inmunes y toros infectados y no infectados (BonDurant, 2005; Mshelia et al., 2010).

Los toros son los reservorios más importantes y diseminan la enfermedad a través de la monta (Eaglesome & Garcia, 1992). *Campylobacter fetus venerealis* se aloja en las criptas prepuciales; los toros no desarrollan signos clínicos o lesiones debido a esta infección, actuando como portadores asintomáticos. La infección no afecta la libido o la calidad del semen (Eaglesome & Garcia, 1992; Pellegrin et al., 2002). Por esta razón, los toros deben ser la categoría elegida para los enfoques de diagnóstico, estudios epidemiológicos, así como estrategias de control y prevención. Después de la transmisión venérea a las hembras, la

infertilidad asociada con la infección por *Cfv* ocurre debido a la endometritis que causa cambios en el entorno uterino que interfieren con la implantación de los embriones. Además, el entorno inhóspito también puede afectar a los embriones que ya están implantados y a los fetos (Genovez, 1997).

La producción de lácteos y carne desempeña un papel importante en la economía de los países sudamericanos. Brasil, Argentina y Uruguay son los tres países con mayor “*stock*” de bovinos en la región, llegando a 172, 57 y 13 millones de cabezas en 2016, respectivamente (IBGE, 2017; DIEA, 2017; SENASA, 2017). La conciencia de la importancia socioeconómica de este sector, y el impacto económico de las enfermedades venéreas del ganado (CGB y tricomosis), condujeron en 2006 a la implementación del Programa Provincial de Control y Erradicación (PCEP) de enfermedades venéreas bovinas por parte del Ministerio de Producción de la provincia de La Pampa, Argentina, junto con el Colegio de Veterinarios, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y el Servicio Nacional de Saneamiento y Salud y Calidad Agroalimentaria (SENASA). La participación en el programa es obligatoria para todos los rebaños en La Pampa, las pruebas deben realizarse antes de los movimientos de los toros. Todos los toros no vírgenes se prueban dos veces al año, y los toros positivos se sacrifican dentro de los 120 días posteriores al diagnóstico (prueba y estrategia de sacrificio). El PCEP demostró ser efectivo para reducir la prevalencia de estas enfermedades entre 2007 y 2014 en la provincia (Molina et al., 2018), proporcionando un marco para establecer procedimientos de muestreo y metodologías de prueba para identificar a los toros infectados de manera más eficiente. Sin embargo, existen dificultades intrínsecas con el diagnóstico de laboratorio de CGB en la región que aún no se han superado para establecer estrategias de control más efectivas (Vázquez et al., 2012).

El diagnóstico de la CGB presenta desafíos importantes. El objetivo de este estudio es revisar y discutir métodos para el diagnóstico de la CGB y su prevalencia e impacto económico en América del Sur.

DIAGNÓSTICO DE LA CGB

Colección de muestras

Para el diagnóstico de la CGB, se han desarrollado varios métodos diagnósticos que demuestran la presencia del *Cfv* (ej. cultivo bacteriano) o algunos de sus componentes (ej. ADN, proteínas) o la respuesta inmune desarrollada por el huésped contra el *Cfv* (ej. ensayos inmunológicos) (OIE, 2017) (Tabla 1). La calidad de las muestras enviadas para las pruebas

de diagnóstico es extremadamente importante porque influye directamente en la precisión de los resultados obtenidos (Figueiredo et al., 2002).

Debido a que los toros son portadores asintomáticos de por vida y diseminadores de la enfermedad, son los animales elegidos para el diagnóstico de la CGB en rodeos endémicos (BonDurant, 2005). *Cfv* establece la colonización persistente de las criptas prepuciales, que puede estar relacionada con la modificación de la composición molecular de los antígenos de superficie bacterianos que le permiten escapar de la respuesta inmune local (Wesley et al., 1989). Dado el nicho ecológico de *Cfv*, las muestras de diagnóstico para detectar o aislar el agente debe tomarse preferiblemente del prepucio de los toros.

Para este propósito, el esmegma se puede obtener de la mucosa prepucial y del pene por tres métodos diferentes: (A) raspaje: realizado mediante la escarificación del prepucio y la mucosa del pene usando un raspador descartable de plástico o uno de metal reutilizable y esterilizable (Tedesco et al., 1977) que luego se enjuaga en PBS; (B) aspiración: realizada a través de una vaina de plástico descartable acoplada a la pipeta de inseminación artificial para aspirar el esmegma; y C) lavado: realizado mediante la introducción de aproximadamente 20-30 ml de PBS en el prepucio, masajeándolo con el ostium cerrado antes de recoger el material a través de un sistema de sifón (OIE, 2017; Terzolo et al., 1992). El raspado prepucial, en comparación con los otros dos métodos, es la técnica de elección porque se identifican más muestras positivas para *C. fetus* cuando se obtienen muestras por este método (Tedesco et al., 1977). McMillen et al., (2006) confirmaron que el método de raspado es más efectivo para recuperar *Cfv* que los otros dos métodos de recolección. Además, los autores enfatizan que esta técnica es más fácil y segura de realizar.

Los toros deben mantenerse en reposo sexual entre 7-15 días antes del muestreo, y se deben realizar tres recolecciones de muestras, con el mismo intervalo de descanso, para aumentar la sensibilidad diagnóstica (Terzolo et al., 1992). Las desventajas de esta práctica incluyen que A-los toros necesitan estar fuera de servicio durante ~45 días, y B-se requieren múltiples visitas a los establecimientos para completar el muestreo, lo que implica mayores esfuerzos logísticos por parte de veterinarios y productores.

Tabla 1: Técnicas disponibles para el diagnóstico de la CGB.

Técnica diagnóstica	Muestras	Tiempo para el diagnóstico	Infección detectable	Diagnóstico de CGB
Cultivo bacteriano e identificación fenotípica	Esmegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	7-10 días	<i>Cfv</i> ; <i>Cff</i>	Variable
IFD	Esmegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	1 días	<i>C. fetus</i>	No
ELISA de antígeno de captura	Esmegma prepucial; mucus vaginal	5-6 días	<i>C. fetus</i>	No
Métodos basados enPCR	Esmegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	4-8 horas	<i>C. fetus</i> ; <i>Cfv</i> ; <i>Cff</i>	Variable
IHQ	tejidos fetales	3 días	<i>C. fetus</i>	No

CGB, campilobacteriosis genital bovina; IFD, Inmunofluorescencia directa; *Cfv*, *Campylobacter fetus venerealis*; *Cff*, *Campylobacter fetus fetus*; IHQ, inmunohistoquímica.

En contraste, las vacas y las vaquillonas infectadas con *Cfv* son colonizadas temporalmente por este patógeno, por lo tanto, de las hembras generalmente no se toman muestras y no se analizan para fines de detección de la enfermedad en rodeos. Sin embargo, cuando se producen pérdidas gestacionales, el moco cervicovaginal y la placenta de las vacas abortadas, y los órganos y fluidos fetales representan muestras de diagnóstico adecuadas (Campero et al., 2003, BonDurant, 2005). Las mismas vainas de plástico acopladas a la pipeta de inseminación artificial utilizada en toros, se pueden utilizar con éxito en las hembras para aspirar el moco cervicovaginal. Esto representa un método de muestreo fácil y práctico. Además, también se puede usar un espéculo estéril para recolectar mucus cervicovaginal (Terzolo et al., 1992; OIE, 2017; Campero et al., 2017).

Los métodos de diagnóstico actuales para CGB incluyen: pruebas que demuestran la presencia de *Cfv* (ej. cultivo bacteriano) o sus componentes (ej. inmunofluorescencia directa o inmunohistoquímica para la detección de proteínas de superficie, métodos basados en PCR para la detección de ADN), o pruebas que apuntan a detectar la respuesta inmune desarrollada por el huésped contra *Cfv* (ej. ensayos inmunoenzimáticos, prueba de aglutinación de mucus vaginal) (Hum et al., 1997; Figueiredo et al., 2002; Campero et al., 2003; Campero et al., 2005; Abril et al., 2007; Iraola et al., 2012; Koya et al., 2015; Marcellino et al., 2015; OIE, 2017).

Cultivo Bacteriano

Las secreciones genitales (esmegma prepucial y mucus cervicovaginal), placenta y fluidos fetales (ej. contenido abomasal) y/o tejidos (ej. hígado y pulmón) representan muestras adecuadas para el aislamiento y la identificación de *Cfv*. En los casos en que se sospecha de CGB, las muestras deben recogerse asépticamente y transportarse al laboratorio de diagnóstico (Terzolo et al., 1992; OIE, 2017). Para aumentar las posibilidades de aislar este microorganismo fastidioso, los cultivos deben realizarse dentro de las 4 h de la recolección de la muestra (Chaban et al., 2013). Sin embargo, el uso de medios de transporte adecuados extiende este período a aproximadamente 24 h (Chaban et al., 2013). Los medios de transporte y enriquecimiento (TEM) están disponibles para optimizar el cultivo, como Weybridge, Cary-Blair, Clark, Thomann, Lander y solución salina estéril al 0,85% (Hum et al., 1994; Monke et al., 2002; OIE, 2017; Harwood et al., 2009). Usualmente, Weybridge TEM es el medio de elección, ya que es eficiente en mantener el *Cfv* viable y reducir la contaminación (Monke et al., 2002). Thomann TEM ha demostrado ser eficaz tanto para el cultivo como para las pruebas de PCR (Harwood et al., 2009).

Las características fisiológicas de *Cfv* dificultan el cultivo de laboratorio ya que este microorganismo microaerófilo y fastidioso requiere condiciones especiales de crecimiento. Los procedimientos para aislar *Cfv* implican el uso de medios de cultivo enriquecidos con antibióticos para minimizar el crecimiento de contaminantes y la incubación en condiciones microaerobias (5–10% de O₂, 5–10% de CO₂, preferiblemente 5–9% de H₂, y el resto de N₂), a 37°C durante un mínimo de 48 h (Terzolo et al., 1992; OIE, 2017).

Se recomiendan medios de cultivo enriquecidos como agar Skirrow, agar verde brillante y agar sangre para el aislamiento de *Cfv*. Cuando se manejan muestras clínicas microbiológicamente complejas, como el esmegma prepucial, el agar Skirrow es la mejor opción (Monke et al., 2002). Este medio contiene inhibidores que minimizan el crecimiento de microorganismos contaminantes indeseables, lo que facilita el desarrollo de *Cfv* y la consiguiente observación de colonias bacterianas compatibles (Monke et al., 2002). La filtración pasiva de la muestra en los medios de cultivo puede aumentar la recuperación de *Cfv* y reducir la contaminación por hongos (Chaban et al., 2013). Además, Skirrow también podría usarse para el aislamiento de *Brucella* spp., Patógenos que comparten nicho y están presentes en América del Sur (Terzolo et al., 1991).

La caracterización morfológica de las colonias bacterianas no es suficiente para la identificación de *Campylobacter* a los niveles de especies y subespecies. Por esta razón, debe

considerarse que *Cff*, que también es clínicamente importante pero no está relacionado con la CGB, puede crecer en los mismos medios selectivos y mostrar características de colonias similares a *Cfv*. Estas subespecies deben distinguirse por sus características fenotípicas basadas en pruebas bioquímicas (BonDurant, 2005, OIE, 2017) o enfoques moleculares (ver la sección sobre métodos basados en PCR a continuación). Mientras que *Cff* produce H₂S y puede crecer en presencia de 1% de glicina y 0.1% de selenito de sodio, *Cfv* no (Véron & Chatelain 1973; OIE, 2017). Sin embargo, existe preocupación acerca de la confiabilidad de estas características bioquímicas para la identificación definitiva de subespecies, ya que algunas cepas de *Cfv* habían adquirido la característica de tolerancia a la glicina. Chang y Ogg (1971) describieron que este proceso ocurrió por transducción y eventos de mutación. Además, el biovar intermedius, como *Cff*, produce H₂S, lo que puede llevar a conclusiones erróneas con respecto a la identificación de *Cfv* (Véron & Chatelain 1973; Van Bergen et al., 2005).

Inmunofluorescencia directa (IFD)

La inmunofluorescencia directa se usa ampliamente para el diagnóstico de la CGB en muestras de esmegma prepucial, mucus cervicovaginal, tejido uterino, placenta y líquido abomasal, pulmón e hígado de fetos abortados (Cipolla et al., 2001; Figueiredo et al., 2002; Campero et al., 2003; Campero et al., 2005; Repiso et al., 2005; Marcellino et al., 2015; Campero et al., 2017), y es recomendado por la OIE como un método de diagnóstico para el comercio internacional (OIE, 2017). Esta prueba demuestra ser muy efectiva incluso en muestras de campo contaminadas. El límite de detección es de 104 y 102 UFC/ml en lavados prepuciales centrifugados y no centrifugados, respectivamente (Figueiredo et al., 2002).

Para IFD, las muestras deben almacenarse en PBS con formalina al 1% después de la recolección. Las muestras genitales se deben centrifugar para eliminar los desechos y las partículas contaminantes. El fluido se coloca en láminas de vidrio y posteriormente se agrega un conjugado de antisuero con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la dilución apropiada. Las láminas se examinan bajo luz ultravioleta en un microscopio de fluorescencia. Las muestras que permiten detectar bacterias fluorescentes con la morfología típica de *C. fetus* se consideran positivas (Figueiredo et al., 2002; OIE, 2017).

Un estudio realizado en Argentina que evaluó el esmegma prepucial y el mucus cervicovaginal a través de IFD determinó una sensibilidad y especificidad de 69.4 y 94.4%, respectivamente (Campero et al., 2017). Un estudio similar en Brasil estimó una sensibilidad del 92.59% y una especificidad del 88.89% (Figueiredo et al., 2002). La interpretación adecuada

de las láminas puede ser un desafío, especialmente cuando hay muestras con baja concentración de *Cfv* en los campos de observación microscópica (Figueiredo et al., 2002; Marcellino et al., 2015). El rendimiento de esta técnica está directamente influenciado por la calidad de la muestra y el microscopio utilizado, y también por la experiencia del observador (Winter et al., 1967), lo que puede conducir a una reducción en la sensibilidad de la prueba. Por lo tanto, la capacitación adecuada del técnico es clave en la interpretación del diagnóstico. Contrariamente a esta afirmación, algunos autores consideran que el efecto de los observadores en el rendimiento de la prueba es mínimo (Figueiredo et al., 2002).

Los protocolos de IFD de rutina generalmente emplean anticuerpos policlonales de FITC producidos en conejo que no discriminan entre las dos subespecies de *C. fetus* (OIE, 2017). Existe un riesgo de resultados falsos positivos de *Cfv* cuando la muestra contiene *Cff* (Figueiredo et al., 2002; OIE, 2017), por lo tanto, se debe tener precaución al interpretar solo los resultados de IFD. Los anticuerpos producidos en pollos (IgY) contra *C. fetus* también pueden emplearse en protocolos de IFD. Aunque los protocolos basados en IgY tienen una sensibilidad similar en comparación con la IgG de conejo, muestran una fluorescencia de fondo no específica más baja y son más baratos de producir (Cipolla et al., 2001).

Sin embargo, la IFD es rápida y ventajosa en comparación con los ensayos que requieren más tiempo para el diagnóstico de *C. fetus*. Usando muestras de mucus vaginal, Marcellino et al., (2015) compararon la eficacia diagnóstica de la técnica de IFD con el cultivo bacteriológico, obteniendo un acuerdo moderado (coeficiente kappa = 0,52) entre estas técnicas. Sin embargo, generalmente las muestras de mucus vaginal no tienen tanta contaminación indeseable como las muestras prepuciales. Teniendo en cuenta que *Cff* y *Cfv* son subespecies de importancia clínica y pueden causar pérdidas reproductivas, IFD es una técnica de fácil aplicación y es adecuada para la detección de *C. fetus* en rodeos endémicos de CGB y episodios de aborto. Sin embargo, para el diagnóstico definitivo de CGB, se necesitan pruebas más específicas y sensibles para proporcionar evidencia de infección por *Cfv*.

Actualmente, la IFD se utiliza ampliamente en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico en América del Sur como la única prueba de diagnóstico para la CGB, posiblemente porque el cultivo es una técnica difícil de ser utilizada en la rutina, y los protocolos de PCR aún no están estandarizados y validados en condiciones sudamericanas. La falta de experiencia, equipo y fondos necesarios para realizar pruebas más sensibles y/o específicas sigue siendo un factor limitante en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario de la región.

ELISA y otros ensayos inmunológicos

Se desarrolló un ELISA para detectar anticuerpos (IgA) específicos para el antígeno *Cfv* en el mucus vaginal y se utilizó en el diagnóstico del aborto inducido por *Cfv* (Hum et al., 1991). En las vacas infectadas, en especial aquellas que abortaron recientemente, existe una fuerte respuesta inmune de los anticuerpos locales en la mucosa vaginal y uterina (Hum et al., 1991). Esta prueba se ha utilizado para detectar CGB en rodeos de bovinos con infertilidad y abortos; se reportó especificidad de 98.5%, aunque no se pudo estimar la sensibilidad (Hum et al., 1994). Se ha postulado que la vacunación contra la campilobacteriosis no interfiere con la prueba ELISA de IgA, ya que solo se secreta IgG, pero no IgA, en el mucus vaginal de las vacas vacunadas (Hum et al., 1994). Como la respuesta inmune en la mucosa prepucial de los toros que portan la bacteria es fugaz (Wesley et al., 1989), se deben evitar las pruebas destinadas a detectar anticuerpos en el esmegma prepucial.

También se han desarrollado pruebas de ELISA para la detección de antígenos de *C. fetus* en cultivos bacterianos enriquecidos. En un estudio, las muestras de campo que incluyen lavados prepuciales, placenta de vacas abortadas y líquido abomasal de fetos abortados, se incubaron durante 4 días en TEM de Clark y luego se analizaron con un ELISA de captura de antígeno basado en anticuerpos monoclonales para la detección de *C. fetus* como una prueba de “screening”. La sensibilidad y especificidad fueron de 100 y 99.5%, respectivamente, en comparación con el cultivo convencional (Devenish et al., 2005).

Se desarrolló un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos séricos contra *C. fetus* con rSapA-N, una proteína recombinante codificada por el gen de virulencia específico de *C. fetus* (SapA). La especificidad y sensibilidad de este método fueron 94.3 y 88.6%, respectivamente (Zhao et al., 2010). Esta prueba no discrimina entre anticuerpos contra las dos subespecies de *C. fetus*.

Los ELISAs pueden usarse como un primer examen de los rodeos infectados, lo que permite el procesamiento rápido de muestras a gran escala (Hum et al., 1994; Brooks et al., 2004; Devenish et al., 2005; Zhao et al., 2010;). Sin embargo, no hay informes de la aplicación de estas técnicas para el diagnóstico de la CGB en países de América del Sur, y los kits comerciales no están disponibles en esta región.

La prueba de aglutinación de mucus vaginal (VMAT) se utilizó en las últimas décadas para detectar anticuerpos en lavados de mucus vaginal. La sensibilidad fue ~50% (Clark et al., 1971; Jesus et al., 1999). Este ensayo resultó en muchas muestras falsas negativas no solo por la baja sensibilidad intrínseca, sino también porque los anticuerpos se detectan en el moco vaginal después de 2 y antes de 7 meses de infección (Hoffer, 1981). Por lo tanto, se desaconsejó

el uso de VMAT. Esta prueba no se ha utilizado ampliamente con fines de diagnóstico en América del Sur.

Métodos basados en la PCR

Los métodos independientes del cultivo, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Van Bergen et al., 2005), la PCR en tiempo real (McMillen et al., 2006; Iraola et al., 2012; Guerra et al., 2014) y la PCR multiplex (Hum et al., 1997; Abril et al., 2007; Groff et al., 2010; Iraola et al., 2012) también son utilizadas para el diagnóstico de CGB. Estos enfoques han mejorado la sensibilidad y la especificidad reportadas en comparación con otras técnicas como el cultivo microbiológico (Guerra et al., 2014). Estas técnicas pueden detectar secuencias específicas de ADN de *Campylobacter* mediante el diseño de cebadores específicos (Hum et al., 1997; Iraola et al., 2012; Iraola et al., 2016).

La diferenciación de *Cfv* de otras especies y subespecies se puede llevar a cabo mediante la clasificación de genotipos moleculares mediante técnicas de PCR multiplex. En estos enfoques, cebadores específicos diseñados para detectar *Campylobacter* spp. a nivel de especies y subespecies son utilizados (Hum et al. 1997; Abril et al., 2007). Otra variación sensible es la PCR en tiempo real que es teóricamente capaz de detectar y cuantificar el ADN de una sola célula de *Cfv* en muestras de campo (McMillen et al., 2006; Iraola et al., 2010; Guerra et al., 2014). Los métodos basados en PCR tienen ventajas sobre los cultivos microbiológicos, como la simplicidad en la interpretación de los resultados. Un protocolo de PCR multiplex dirigido a secuencias presentes en *Cfv* pero no en *Cff*, se desarrolló en Uruguay (Iraola et al., 2012). Curiosamente, el ADN genómico se extrae directamente del líquido abomasal de los fetos bovinos abortados y el proceso posterior implica solo un paso (Iraola et al., 2012). Aplicando este protocolo, *Cfv* biovar *intermedius* podría detectarse cuando los cultivos y las pruebas bioquímicas no son consistentes (Iraola et al., 2012; Van der Graaf-van Bloois et al., 2013; Iraola et al., 2013). Sin embargo, un estudio reciente demuestra que el gen *virB11*, utilizado como el gen específico para la diferenciación entre subespecies en el protocolo de PCR mencionado anteriormente (Iraola et al., 2012), no está presente exclusivamente en las cepas *Cfv* y no siempre está ausente en las cepas *Cff* (Van der Graaf–van Bloois et al., 2016).

El genoma completo de una cepa argentina de *Cfv* biovar *intermedius* fue secuenciado (Iraola et al., 2013). La información genómica de tales cepas atípicas optimizaría el desarrollo de herramientas para un diagnóstico molecular más específico. Recientemente, el estudio de dos genomas reportó incongruencias entre los linajes de *Cff* y

Cfv y las características bioquímicas utilizadas para su diferenciación, cuestionando la relevancia clínica de subtipar estas cepas en mamíferos (Van der Graaf-van Bloois et al., 2014; Van der Graaf–van Bloois et al., 2016).

Van der Graaf-van Bloois et al., (2013) probaron cinco PCR que los laboratorios de diagnóstico utilizan habitualmente, y sorprendentemente ninguno de ellos pudo identificar correctamente las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie. Todas las pruebas se compararon con los métodos de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) (Wagenaar et al., 2001) y tipificación de secuencia multilocus (MLST) (Van Bergen et al., 2005), que hasta ahora son las únicas técnicas que han demostrado diferenciar de manera confiable las dos subespecies. Desafortunadamente, estos ensayos son engorrosos, costosos y poco prácticos para el uso rutinario.

La diferenciación de las subespecies de *C. fetus* es esencial para la implementación de programas eficaces de control y erradicación del *Cfv*, y para investigar la importancia en la salud pública. Sin embargo, su evolución genómica en mamíferos sigue siendo poco conocida. Un estudio reciente proporciona la estructura filogenética y evolutiva de *C. fetus* que podría guiar el desarrollo de métodos para la diferenciación y vigilancia epidemiológica de cepas bovinas y humanas (Iraola et al., 2017).

En América del Sur, a pesar de que las pruebas moleculares se han desarrollado y utilizado en los últimos años, su aplicabilidad al diagnóstico de laboratorio de rutina está actualmente en discusión. Esto se debe a la discrepancia entre los resultados obtenidos por diferentes protocolos, y porque la mayoría de los protocolos no se pueden realizar con confianza directamente en el ADN extraído de muestras de campo (el. esmegma prepucial). Estos factores han conducido hasta ahora a la no aceptabilidad de la técnica por parte de veterinarios de campo y laboratorios de diagnóstico. Aunque es probable que estas tecnologías sean cada vez más adaptadas por los laboratorios veterinarios en los próximos años, especialmente teniendo en cuenta que son aceptadas por las normas de la OIE (OIE, 2017). Las pruebas fenotípicas siguen siendo las únicas confiables y disponibles en América del Sur para la identificación de subespecies. Sin embargo, son poco reproducibles y no corresponden a las características genómicas de algunas cepas (Van der Graaf-van Bloois et al., 2014; Van der Graaf–van Bloois et al., 2016). Debido a estos aspectos, se necesita más investigación para validar las técnicas moleculares con cepas aisladas localmente y evaluar su aplicabilidad en la región.

Métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos

La histología y la inmunohistoquímica son métodos de diagnóstico útiles y efectivos en casos naturales de abortos bovinos por *C. fetus* (Campero et al., 2005), particularmente en fetos y placentas de los cuales *C. fetus* no puede aislarse con éxito debido a la mala conservación de las muestras (ej. fetos abortados que están autolíticos, congelados o deteriorados a su llegada al laboratorio) (Morrell et al., 2011).

Las principales lesiones histológicas en fetos abortados son neumonía supurativa, miocarditis, serositis fibrinosa, nefritis intersticial, hepatitis, gastroenteritis, meningitis y placentitis necrotizante; sin embargo, estas lesiones no son patognomónicas de la infección por *C. fetus* (Campero et al., 2005; Morrell et al., 2011; Koya et al., 2015). La inmunohistoquímica para la detección de antígenos de *C. fetus* en tejidos embebidos en parafina fijados con formalina, en ausencia de aislamiento bacteriano y evidencia molecular de infección, es un método alternativo y práctico para establecer el diagnóstico en fetos abortados (Campero et al., 2005; Morrell et al., 2011; Campero et al., 2017).

El examen patológico junto con la IFD y/o cultivo bacteriano se ha utilizado ampliamente en Brasil, Argentina y Uruguay para el diagnóstico de aborto inducido por *Campylobacter* (Campero et al., 2003; Campero et al., 2005; Easton, 2006; Fernandez et al., 2007; Morrell et al., 2011; Antoniassi et al., 2013; Bove et al., 2013). Sin embargo, este no parece ser una metodología diagnóstica ampliamente utilizada en otros países de la región.

IMPACTO ECONÓMICO Y PREVALENCIA

La campilobacteriosis genital bovina es una enfermedad de distribución mundial (Mshelia et al., 2010). La prevalencia es alta en los países en desarrollo donde se practica ampliamente la cría extensiva de los bovinos (BonDurant, 2005), y el estatus de infección en estos rodeos puede pasarse por desapercibido. Campilobacteriosis genital bovina puede conducir a pérdidas económicas significativas en países que mantienen un manejo reproductivo basado en la monta natural con toros, como Uruguay, Brasil, Argentina y Colombia (Lage & Leite, 2000; INALE, 2014).

Los estudios en rodeos de carne muestran que la enfermedad puede ocasionar a una reducción del 15 al 25% en las tasas de preñez (Campero, 2000). En los rodeos lecheros, la infección por *C. fetus* influyó negativamente en la producción de leche (Akhtar et al., 1993), sin embargo, estas pérdidas no se cuantificaron. Teniendo en cuenta que el costo de un aborto en bovino lechero en los Estados Unidos se ha estimado en aproximadamente \$ 555 por

animal (De Vries, 2006), una hipotética reducción del 20% por pérdidas gestacionales en un rodeo de 1000 vacas preñadas representaría una pérdida económica de \$ 111000.

No hay literatura disponible sobre la cuantificación de las pérdidas económicas causadas por la CGB en América del Sur. En las últimas décadas, se ha informado una alta prevalencia de CGB en rodeos lecheros y de carne en Brasil (Pellegrin et al., 2002; Stynen et al., 2003; Filho et al., 2018), Uruguay (Repiso et al., 2005), Argentina (Molina et al., 2013; Campero et al., 2017; Molina et al., 2018) y Colombia (Griffiths et al., 1984). En la Tabla 2 se presenta un resumen de los estudios que informan la prevalencia de CGB en diferentes regiones de países de la América del Sur entre 1984 y 2018. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios se realizaron con pocos establecimientos, por lo que es probable que no reflejen con precisión la verdadera prevalencia, como lo destacó Molina et al., (2018).

La prevalencia de CGB a nivel de rodeos en diferentes regiones de los países estudiados osciló entre 2,3 y 100%. Se espera esta dispersión ya que la transmisión de la enfermedad depende de las prácticas de manejo sanitario y reproductivo utilizadas en cada predio (McFadden et al., 2005). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en muchos de estos estudios las diferencias podrían estar asociadas con las pruebas de diagnóstico utilizadas. La mayoría de los estudios se basaron en la IFD (Tabla 2) que no distingue entre las subespecies de *C. fetus* (Figueiredo et al., 2002). La inmunofluorescencia directa no debe usarse como única técnica de diagnóstico para confirmar la infección por *Cfv*.

En Uruguay, en un estudio nacional en bovinos de carne se evaluaron 1754 muestras de esmegma prepucial y se determinó prevalencia de 28% de los toros positivos en 142 de 230 (37%) establecimientos. El diagnóstico se realizó mediante IFD y cultivo bacteriano directamente de muestras de esmegma prepucial enriquecidas en TEM durante 72 h. En 47 de los predios, el aislamiento de *C. fetus* fue exitoso y 35 (75%) de estos aislamientos se identificaron como *Cfv* (Repiso et al., 2005). El cultivo y la identificación de *Cfv* confirmaron de manera confiable la CGB en el 15,2% de los rodeos, lo que sugiere que la prevalencia del 37% probablemente fue sobreestimada. Estas variaciones pueden haber ocurrido debido a las diferencias entre sensibilidad y especificidad inherentes a las pruebas de diagnóstico utilizadas en diferentes estudios. También se han llevado a cabo varios estudios en diferentes regiones de Brasil, diagnosticando CGB por IFD en hasta el 51.7% de los animales evaluados (Pellegrin et al., 2002; Stynen et al., 2003; Miranda, 2005; Alves et al., 2011). Rocha et al., (2009) determinaron que la prevalencia en toros, mediante IFD, fue del 35,9%; sin embargo, cae al 10,3% cuando se usa cultivo bacteriano.

Los trabajos más recientes realizados utilizando técnicas de PCR que son más específicas y sensibles que la IFD y tendían a diferenciar entre subespecies de *C. fetus* determinaron una prevalencia menor de 7,7% (Filho et al., 2018) y 1,8% (Oliveira et al., 2015), en diferentes regiones de Brasil. Además, Filho et al., (2018) confirmaron los hallazgos a través de la secuenciación del genoma completo de las cepas.

La inmunofluorescencia directa se puede usar como prueba de detección para *C. fetus* (Pellegrin et al., 2002; Stynen et al., 2003; Repiso et al., 2005; Miranda, 2005; Rocha et al., 2009; Molina et al., 2013). Sin embargo, la IFD no debe usarse para el diagnóstico definitivo de infección por *Cfv*. Los métodos basados en PCR y el cultivo bacteriano presentaron mejores resultados para estimar la prevalencia de la CGB (Filho et al., 2018; Griffiths et al., 1984). Sin embargo, una evaluación crítica de relevancia clínica es necesaria cuando el diagnóstico de la CGB se establece mediante pruebas fenotípicas (Van der Graaf-van Bloois et al., 2014) y genotípicas solas (Sanhueza et al., 2014). On y Harrington (2001) argumentan que la combinación de métodos de identificación (fenotipo y PCR) apoya principalmente la división taxonómica de la especie; sin embargo, el uso de más de un método es necesario porque la identificación precisa entre subespecies sigue siendo problemática.

Considerando que las pruebas de diagnóstico confiables para la detección de *Cfv* y *Cff* no están validadas en América del Sur y no informan la prevalencia real, recomendar estrategias de control adecuadas es una tarea difícil (Molina et al., 2018). En este punto, las técnicas de IFD o PCR, podrían usarse para detectar *C. fetus* sin ignorar el aislamiento y la identificación fenotípica. El aislamiento, además de seguir siendo esencial para el diagnóstico, también es fundamental para identificar las cepas circulantes y realizar estudios moleculares, además de determinar el posible papel de las cepas *Cff* en la producción de enfermedades venéreas.

Tabla 2: Estudios que reportan la prevalencia de la CGB en diferentes regiones de países sudamericanos entre 1984 y 2018.

País	Región	Técnica diagnóstica	Origen de la muestra	Prevalencia				Referencia
				N° rodeos (+/total)	Rodeos (%)	N° animal (+/total)	Animal (%)	
Brasil	MS	IFD ^a	Toro	17/19	-	171/327	51.7	Pellegrin et al., 2002
	MG	IFD ^a	Vaca	9/9	100	40/157	25.5	Stynen et al., 2003
	BA, GO, MA, MT, MS, MG, PA, PR, RS, RO, SP e TO	IFD ^a	Toro	224/1191	19.7	61/120	50.8	Miranda, 2005
	RJ	IFD ^a y A ^b	Toro	-/9	-	14 y 4/39	35.9 y 10.3	Rocha et al., 2009
	RS	PCR ^c	Toro / Vaca / Feto	40/91	44	89/816	10.9	Ziech et al., 2014
	PE	PCR ^c	Vaca	6/21	28.6	7/383	1.8	Oliveira et al., 2015
	PB	PCR ^c	Vaca	6/19	31.6	21/273	7.7	Filho et al. 2018
Argentina	La Pampa	IFD ^a	Toro	86/3766	2.3	437/29178	1.5	Molina et al., 2013
	Diferentes regiones	-	Toro	-	9.8-15.3	-	1-5	Campero et al., 2017
Uruguay	La Pampa	IFD ^a	Toro	-/6000	3-10	-	-	Molina et al., 2018
	Nacional	IFD ^a y A ^b	Toro	85/230	37	492/1754	28.05 y 12	Repiso et al., 2005
Colombia	Piemonte, Caribe, Andina	A ^b	Toro	-/113	19.4	-	15	Griffiths et al., 1984

MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; BA, Bahia; GO, Goiás; MA, Maranhão; MT, Mato Grosso; PA, Pará; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RO, Rondonia; SP, São Paulo; TO, Tocantins; RJ, Rio de Janeiro; PE, Pernambuco; PB, Paraíba.

^aInmunofluorescencia directa; ^bAislamiento; ^cPolymerase Chain Reaction. – no informado.

CONCLUSIONES

Se sabe que la campilobacteriosis genital bovina causa pérdidas reproductivas en varios países de América del Sur, sin embargo, estas pérdidas no se han cuantificado. La falta de disponibilidad generalizada de técnicas simples, sensibles y específicas para el diagnóstico de la infección por *Cfv* en los laboratorios veterinarios, combinada con una infraestructura de laboratorio limitada, recursos insuficientes para el desarrollo, son factores clave que limitan el diagnóstico correcto y el control de CGB en la región.

Se deben realizar estudios epidemiológicos más amplios para determinar la prevalencia, los factores de riesgo y, en consecuencia, estimar las pérdidas económicas de la CGB en América del Sur. Debido a que los toros son portadores de *Cfv* de por vida, deberían ser los principales animales a ser muestreados en rodeos endémicos y dichas muestras analizadas para la detección confiable de *Cfv* con pruebas de diagnóstico confirmatorias.

La combinación de pruebas diagnósticas aumenta la efectividad de los resultados cuando interpretadas correctamente. El ELISA de captura y la IFD determinan la presencia de *C. fetus*, pero deben usarse junto con el aislamiento bacteriano y la identificación fenotípica para el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad. El aislamiento de *Cfv* es

crucial para obtener cepas autóctonas para futuras investigaciones y para desarrollar y validar técnicas y reducir el costo del diagnóstico. Métodos basados en la PCR son herramientas disponibles para confirmar las pruebas fenotípicas. Estos métodos parecen ser prometedores para el diagnóstico en muestras de campo de esmegma prepucial, mucus vaginal y tejidos y/o fluidos de fetos y/o placentas abortados, así como aislamientos bacterianos. Se recomienda el uso de estas técnicas para la identificación inequívoca de *Cfv* y, por lo tanto, el diagnóstico final de la CGB porque son más específicas y sensibles y pueden llegar a diferenciar entre las subespecies de *C. fetus*. Los laboratorios de diagnóstico veterinario en América del Sur deberían trabajar para acreditar y validar las pruebas de diagnóstico para proporcionar diagnósticos confiables a los veterinarios y productores con el objetivo de controlar o erradicar la CGB de los rodeos endémicos y prevenir la introducción de toros infectados en predios libres de esta enfermedad.

Aunque la CGB es endémica, todavía no hay protocolos oficiales con respecto al control de la CGB en rodeos sudamericanos. El desarrollo de políticas regionales de salud con monitoreo y vigilancia ayudaría a establecer programas de control y erradicación.

8. CAPÍTULO 3: ESTUDIO COMPARATIVO DE ELISAs COMERCIALES PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LA INVESTIGACIÓN DIAGNÓSTICA DEL ABORTO ASOCIADO A *Neospora caninum* EN RODEOS DE BOVINOS LECHEROS DE URUGUAY

RESUMEN

El aborto bovino ocasiona cuantiosas pérdidas económicas para la industria ganadera mundialmente, y reviste importancia en salud pública y seguridad alimentaria, dado que muchos agentes infectocontagiosos abortigénicos en bovinos, son zoonóticos. A pesar de su importancia, el diagnóstico etiológico de aborto en bovinos representa un desafío técnico para los veterinarios clínicos y laboratoristas, debido parcialmente a la dificultad de recuperar fetos abortados en condiciones extensivas de campo, para investigación diagnóstica patológica y microbiológica, así como de la detección temprana de los vientres abortados. *Neospora caninum* es un protozooario cosmopolita identificado como uno de los principales agentes abortigénicos en bovinos mundialmente. En este estudio proponemos una aproximación seroepidemiológica comparativa para el diagnóstico de aborto por *N. caninum* en bovinos lecheros. Se procesaron muestras de entre 12 y 93 vacas/vaquillonas con (casos) y sin (controles) historia reciente de aborto en cuatro tambos comerciales. La proporción de controles:casos fue de 1:1 a 4.6:1. Las muestras (n=230) fueron analizadas mediante tres kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-*N. caninum*. En los cuatro tambos, la proporción de vacas seropositivas por cualquier kit fue significativamente mayor en los casos respecto de los controles (Odds Ratios=5.13 a 36, p=0.0002 a 0.0485). La concordancia entre los kits varió de débil a fuerte (coeficiente Kappa de Cohen=0.58 a 0.83). Concluimos que, a pesar de la imperfecta concordancia entre estos kits, el empleo de cada uno de ellos permitió arribar a conclusiones similares respecto de la asociación estadística entre seropositividad a *N. caninum* y aborto, lo que representa una herramienta útil para la aproximación diagnóstica a nivel poblacional en condiciones de campo.

Palabras clave: aborto, bovinos, coeficiente Kappa de Cohen, ELISA, epidemiología, *Neospora caninum*, serología.

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozooario intracelular obligado del filo Apicomplexa y es una de las principales causas identificadas de aborto en bovinos de todo el mundo (Dubey & Schares, 2011). Este parásito tiene un ciclo heteroxeno en el que los hospederos definitivos son los caninos (perros, lobos, coyotes y dingos), que eliminan ooquistes infecciosos en las heces (Dubey et al., 2007) y horizontalmente son transmitidos por vía digestiva a una gran variedad de hospederos intermediarios, que incluye los bovinos, venados, ovinos, búfalos, roedores, aves y caballos (Dubey & Schares, 2011). En los bovinos también ocurre

frecuentemente la transmisión vertical por vía transplacentaria, con tasas reportadas de 40-95% entre los terneros nacidos de vacas seropositivas (Reichel et al., 2014), siendo esta una de las principales vías de perpetuación transgeneracional del agente en los rodeos. Dado que se carece a nivel comercial de tratamientos específicos o vacunas eficaces para la prevención del aborto por neosporosis bovina, el control de la enfermedad está prácticamente restringido a la detección serológica y eliminación de los bovinos infectados de los rodeos, y a evitar el contacto entre el alimento de los bovinos y la materia fecal de los huéspedes definitivos potencialmente eliminadores de ooquistes.

A nivel global se estima que las pérdidas económicas medias anuales por neosporosis bovina ascienden a US\$ 633.4-2380.1 miles de millones (Reichel et al., 2013). Los países sudamericanos, con economías agroexportadoras y donde el agente está ampliamente difundido (Moore, 2005), no escapan a esta situación. En Argentina y Brasil, las pérdidas anuales por neosporosis bovina se han estimado en US\$ 51.8-142.9 millones y US\$ 99.4-223 millones, respectivamente (Reichel et al., 2013). En Argentina, estas pérdidas únicamente en la Pampa Húmeda son de aproximadamente US\$ 15.62-119.35 millones para la ganadería lechera, y US\$ 1.13-42.1 millones para la ganadería de carne (Moore et al., 2013).

A pesar de que la neosporosis está ampliamente distribuida en rodeos bovinos de Uruguay, las pérdidas económicas no han sido determinadas. Estudios seroepidemiológicos publicados a nivel nacional reportaron prevalencias de anticuerpos anti *N. caninum* que varían entre 61.3 y 76.8% a nivel predial (prevalencia de rodeos), y de 13 a 28% a nivel individual, tanto en ganado de carne como de leche (Kashiwazaki et al., 2004; Piaggio et al., 2004; Repiso et al., 2005; Bañales et al., 2006; Furtado et al., 2011). Un estudio más reciente (2015) de representatividad nacional indicó prevalencias prediales de 86.5 y 96% para establecimientos de carne y leche, respectivamente, y prevalencias individuales de 22.3% en ganado lechero, y de 14.3% en ganado de carne (Dr. Federico Fernández, MGAP, comunicación personal 2018). Asimismo, una gran proporción de los abortos bovinos diagnosticados en laboratorios veterinarios del país son causados por este agente (Kashiwazaki et al., 2004; Bañales et al., 2006; Easton, 2006; Macías-Rioseco et al., 2018), similar a lo reportado en Argentina (Moore et al., 2008; Calandra et al., 2014) y sur de Brasil (Macedo et al., 2017).

El diagnóstico etiológico del aborto bovino es complejo y requiere del examen de laboratorio de fetos y placentas de vacas/vaquillonas abortadas (Gädicke & Montib, 2008), incluyendo el examen patológico macroscópico e histológico, y una amplia variedad de

pruebas de diagnóstico microbiológicas para la detección de agentes infecciosos abortigénicos (Campero et al., 2003), algunas de las cuales no están ampliamente disponibles en laboratorios de diagnóstico veterinario en América del Sur. El correcto diagnóstico etiológico del aborto es un insumo fundamental para controlar y/o prevenir estas pérdidas a nivel predial, así como desde el punto de vista de la salud pública y seguridad alimentaria, considerando que varios de los microorganismos causales de aborto en bovinos son zoonóticos.

En producciones ganaderas extensivas, como ocurre en la mayoría de los países sudamericanos, la recuperación de fetos y placentas expulsados espontáneamente por hembras bovinas que sufren abortos antes de que sean depredados o descompuestos para ser enviados a laboratorios de diagnóstico, representa un desafío adicional para el diagnóstico etiológico (Campero et al., 2003). Sin embargo, la identificación de animales que perdieron la gestación suele ser simple a través de un examen visual y/o clínico de campo realizado por veterinarios o productores agropecuarios, lo que permite la obtención de muestras de sangre o leche de estos animales para análisis laboratorial.

Un enfoque serológico poblacional en vacas/vaquillonas abortadas y no abortadas usando ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), para el diagnóstico indirecto de infección por *N. caninum* por detección de anticuerpos en suero, plasma o leche (Alvarez-García et al., 2013), puede ser de utilidad para la aproximación diagnóstica de abortos causados por este agente (Roelandt et al., 2015). Las pruebas de ELISA demuestran un alto rendimiento en términos de sensibilidad y especificidad (Alvarez-García et al., 2013), y se encuentran disponibles comercialmente en Sudamérica, a través de una variedad de proveedores europeos y norteamericanos, a pesar de que las mismas no necesariamente han sido adecuadamente validadas en nuestra región.

El objetivo de este trabajo es describir una estrategia serológica comparativa poblacional usando 3 kits de ELISA comerciales, que pueda resultar útil para la investigación diagnóstica del aborto bovino asociado a *N. caninum*, particularmente en rodeos donde no sea posible obtener fetos abortados para investigación de laboratorio, que sea práctica y fácil de aplicar e interpretar por médicos veterinarios clínicos y laboratoristas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras

Se evaluaron muestras de suero bovino almacenadas en un banco de sueros congelados (-20°C) en INIA La Estanzuela. Se seleccionaron aquellas muestras que fueran

provenientes de episodios de aborto espontáneo en tambos, considerando que se contara con muestras de vacas/vaquillonas abortadas y no abortadas contemporáneamente en un mismo predio. Las muestras que cumplieron con estos criterios de inclusión eran provenientes de 4 episodios independientes de aborto espontáneo en ganado lechero en 4 establecimientos agropecuarios (tambos A-D) de Uruguay. Las muestras se habían obtenido simultáneamente de vacas/vaquillonas abortadas recientemente (casos) y vacas/vaquillonas preñadas no abortadas apareadas por categoría y ubicación (controles). Las muestras habían sido obtenidas por los veterinarios asesores de dichos establecimientos y enviadas al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela. La información sobre el número de animales en los rodeos, la raza, la categoría, el número de animales muestreados, las tasas de abortos, las fechas de muestreo y el departamento donde se ubicaban los establecimientos se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de bovinos totales, abortados y controles muestreados, raza, categoría, tasa de aborto, fecha del muestreo y localización geográfica de los 4 tambos evaluados.

Tambo	Total de bovinos en el rodeo	Nº de bovinos abortados muestreados	Nº de bovinos controles muestreados	Raza y categoría	Tasa de aborto	Fecha del muestreo	Departamento
A	2000	31	62	Holstein, Vq	15.5%	Abr, 2017	Colonia
B	200	6	6	Holstein y cruza Holstein, Vq	3%	Nov, 2017	Colonia
C	300	12	55	Holstein, Vc	ND (>5%)	Dic, 2017	Lavalleja
D	1505	19	39	Holstein y cruza Holstein x Jersey, Vc	16.3%	Dic, 2018	Florida
Total	4505	68	162	-	-	-	-

Vc: vaca, Vq: vaquillona, ND: no determinado.

Serología

Todas las muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron mediante 3 kits comerciales de ELISA indirecto que detectan anticuerpos isotipo IgG específicos contra *N. caninum*, siguiendo las recomendaciones de sus fabricantes. Los kits usados han sido previamente utilizados y comparados con otras pruebas serológicas y serotecas de referencia en varias publicaciones (Álvarez-García et al., 2003; ; Ghalmi et al., 2009; Alvarez-García et al., 2013), mostrando un buen desempeño, e incluyeron: 1) LSIVet, Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, Lelystad, Países Bajos; 2) Hipra, CIVTEST® BOVIS NEOSPORA, Girona, España; y 3) BioX Diagnostics, NEOSPORA CANINUM ELISA KIT, Rochefort, Bélgica. Los kits 1 y 2 están

manufacturados utilizando lisados de taquizoítos de *N. caninum* como antígeno, mientras que el kit 3 utiliza una proteína recombinante de *N. caninum* (NcSRS2).

Se utilizó un espectrofotómetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) para la lectura de la densidad óptica (DO) de cada pocillo de las microplacas, con filtros de 450 nm para los kits 1 y 3, y de 405 nm para el kit 2, como indican las instrucciones de cada uno de los mismos. Para obtener los resultados, se leyeron las DO de los sueros controles positivos y negativos provistos con cada kit y las DO de las muestras, y se aplicaron las fórmulas recomendadas por los fabricantes de cada kit. Las muestras de suero analizadas con los kits 1 y 3, fueron clasificadas como negativas o positivas. El kit 2 clasifica sus resultados en 3 categorías: positivo, sospechoso o negativo. Los resultados individuales para cada animal se registraron en una planilla de Microsoft Excel®.

Análisis estadísticos

Se calculó el porcentaje de animales seropositivos para cada tambo con cada kit. Para este cálculo, los resultados sospechosos para el kit 2 fueron considerados como no positivos, por lo tanto, el número de animales sospechosos fue incluido en el denominador. Los resultados fueron analizados empleando modelos lineales generalizados mixtos (Proc. GLIMMIX, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El kit de ELISA usado, el tambo, y la interacción entre ambos, fueron incluidos como efectos fijos, y el animal fue considerado como efecto aleatorio. Se asumió una distribución binomial de la variable respuesta y una función de ligadura “logit”. Cuando fue necesario, las comparaciones múltiples se ajustaron utilizando el método de HSD (“honestly-significant-difference”) de Tukey-Kramer. Los intervalos de confianza (IC) al 95% se calcularon empleando el método de la razón de verosimilitud.

Además, los resultados se evaluaron en el contexto de la historia del aborto para cada bovino analizado, independientemente en cada uno de los 4 establecimientos, y se calcularon las razones de probabilidades (Odds Ratio, OR) para estimar el riesgo de aborto en forma relativa al estatus serológico, utilizando un software estadístico de libre acceso disponible online (MedCalc Free Statistical Calculators, Medcalc Software bvba, Ostend, Bélgica, https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Para este cálculo, los animales seropositivos con historia reciente de aborto se computaron como expuestos positivos (celda a), los seropositivos sin historia reciente de aborto como positivos controles (celda c), los seronegativos con historia reciente de aborto como expuestos negativos (celda b), y los seronegativos sin historia reciente de aborto como no expuestos negativos (celda d). Se

registró el OR, el IC del 95% y el p-valor, considerando $p < 0.05$ para establecer significancia estadística. Los resultados sospechosos para el kit 2 en los cuatro tambos fueron desconsiderados para este análisis estadístico, incluyéndose sólo los positivos y negativos.

Por último, la concordancia entre los tres kits de ELISA se evaluó en base al porcentaje de acuerdo positivo, negativo y total (Cicchetti & Feinstein, 1990) y mediante el coeficiente kappa (K) de Cohen (Proc. FREQ, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los valores de K fueron interpretados según McHugh (McHugh, 2012), como sigue: $K = 0-0.20$ sin concordancia, $K = 0.21-0.39$ concordancia mínima, $K = 0.40-0.59$ concordancia débil, $K = 0.60-0.79$ concordancia moderada, $K = 0.80-0.90$ concordancia fuerte, y $K > 0.90$ concordancia casi perfecta. Los resultados sospechosos para el kit 2 en los cuatro tambos también fueron desconsiderados para este análisis.

RESULTADOS

Del total de animales analizados ($n=230$), 112 (48.7%) fueron positivos con el kit 1, 110 (47.8%) con el kit 2 y 138 (60.0%) con el kit 3 (Tabla 2). La proporción de animales seropositivos difirió significativamente entre kits ($p < 0.01$), pero no entre tambos ($p = 0.43$). El porcentaje de seropositividad fue significativamente mayor para el kit 3 respecto de los kits 1 y 2 ($p < 0.01$), mientras que este no difirió entre los kits 1 y 2 ($p = 0.97$). Las diferencias apreciadas entre kits no fueron afectadas significativamente por el tambo (efecto tambo \times kit $p = 0.78$). Los resultados en la categoría “sospechoso” para el kit 2 incluyeron en total 11/230 animales (4.8%), distribuidos de la siguiente manera: 2/93 animales (2.2%) para el tambo A, 0/12 animales (0%) para el tambo B, 4/67 animales (6%) para el tambo C, y 5/58 animales (8.6%) para el tambo D.

Tabla 2. Porcentaje de seropositividad a *N. caninum* según los 3 kits de ELISA usados en cada uno de los 4 tambos evaluados.

Kit de ELISA	Tambo (total de bovinos muestreados)	Seropositividad			
		n	Porcentaje (%)	Error Estándar	IC _{95%}
1	A (n= 93)	42	45.2	5.2	35.3 – 55.3
	B (n= 12)	6	50.0	14.4	23.8 – 76.2
	C (n= 67)	33	49.3	6.1	37.5 – 61.1
	D (n= 58)	31	53.5	6.6	40.7 – 65.7
	Total (n= 230)	112	48.7^a	3.3	42.3 – 55.1
2	A (n= 93)	41	44.1	5.2	34.3 – 54.2
	B (n= 12)	6	50.0	14.4	23.8 – 76.2
	C (n= 67)	32	47.8	6.1	36.1 – 59.5
	D (n= 58)	31	53.5	6.6	40.7 – 65.7
	Total (n= 230)	110	47.8^a	3.3	41.4 – 54.3
3	A (n= 93)	48	51.6	5.2	41.5 – 61.6
	B (n= 12)	6	50.0	14.4	23.8 – 76.2
	C (n= 67)	44	65.7	5.8	53.9 – 76.3
	D (n= 58)	40	69.0	6.1	56.4 – 79.9
	Total (n= 230)	138	60.0^b	3.2	53.6 – 66.2

Kit 1: LSIVet, Kit 2: Hipra, Kit 3: BioX.

^{a,b} Porcentajes con superíndices distintos difieren significativamente ($p < 0.05$, Ajuste de Tukey-Kramer). IC: intervalo de confianza.

Los porcentajes de animales seropositivos abortados y no abortados en cada tambo, y los resultados del análisis estadístico para establecer asociación entre seropositividad e historia de aborto para cada uno los kits de ELISA evaluados (OR, IC y p-valores), se resumen en la Tabla 3. Independientemente del kit de ELISA utilizado, en los 4 establecimientos estudiados, las vacas/vaquillonas seropositivas tuvieron una chance significativamente mayor de pertenecer al grupo de animales con un historial reciente de aborto, respecto de las vacas/vaquillonas seronegativas. El kit empleado no afectó significativamente la asociación entre el estatus serológico y la ocurrencia de aborto en ninguno de los tambos. Las concordancias entre los 3 kits evaluados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 3. Porcentaje de seropositividad a *N. caninum* según los 3 kits de ELISA para anticuerpos anti-*Neospora caninum*, en los bovinos abortados y no abortados, y asociación estadística con el aborto en cada uno de los 4 tambos evaluados.

Tambo	Kit de ELISA	% de bovinos abortados seropositivos	% de bovinos controles seropositivos	OR, IC _{95%} , p valor
A	1	70.1% (22/31)	32.3% (20/62)	OR=5.13, IC=2-13.15, p=0.0007
	2	73.3% (22/30)	31.1% (19/61)	OR=6.07, IC=2.2-16.09, p=0.0003
	3	80.6% (25/31)	37.09% (23/62)	OR=7.06, IC=2.5-19.77, p=0.0002
B	1	83.3% (5/6)	16.7% (1/6)	OR=25, IC=1.2-520.76, p=0.0377
	2	83.3% (5/6)	16.7% (1/6)	OR=25, IC=1.2-520.76, p=0.0377
	3	83.3% (5/6)	16.7% (1/6)	OR=25, IC=1.2-520.76, p=0.0377
C	1	91.7% (11/12)	40.0% (22/55)	OR=17, IC=2.05-141.1, p=0.0087
	2	91.7% (11/12)	41.2% (21/51)	OR=17.7, IC=1.8-131.14, p=0.0109
	3	100% (12/12)	58.2% (32/55)	OR=18.07, IC=1.02-320.79, p=0.0485
D	1	94.7% (18/19)	33.3% (13/39)	OR=36, IC=4.31-300.1, p=0.0009
	2	94.7 % (18/19)	38.2% (13/34)	OR=29.07, IC=3.45-244.48, p=0.0019
	3	100% (19/19)	53.8% (21/39)	OR=33.5, IC=1.89-594.92, p=0.0166

Kit 1: LSIVet, Kit 2: Hipra, Kit 3: BioX, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

Tabla 4. Porcentaje de acuerdo y concordancia entre los 3 kits de ELISA comercial utilizados para detección de anticuerpos contra *N. caninum* en los 4 tambos evaluados.

Kits de ELISA	Nro. de muestras	Porcentaje de acuerdo			Concordancia		
		Negativo	Positivo	Total	Kappa	IC _{95%}	Interpretación
1 vs. 2	219	91.3	91.3	91.3	0.83	0.75-0.90	Moderada a fuerte
1 vs. 3	230	77.1	80.8	79.1	0.58	0.48-0.69	Débil a moderada
2 vs. 3	219	83.7	86.8	85.4	0.71	0.62-0.80	Moderada a fuerte

Kit 1: LSIVet, Kit 2: Hipra, Kit 3: BioX, IC: intervalo de confianza.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de exposición a *N. caninum* en bovinos vivos se realiza principalmente por serología, detectando anticuerpos en suero, plasma sanguíneo o leche de animales a nivel individual o colectivamente en vacas en lactancia mediante análisis de muestras del tanque de leche (Alvarez-García et al., 2013; Sekiya et al., 2013). En este estudio, el diagnóstico fue realizado en suero sanguíneo de vacas/vaquillonas con el propósito de buscar asociación con el aborto, ya que no fue posible la obtención de los fetos o placentas de las vacas

abortadas debido al manejo pastoril extensivo de los rodeos, situación muy frecuente en los tambos de países de Sudamérica.

La serología es un indicador que permite evaluar la chance de que las vacas aborten (Roelandt et al., 2015), sin embargo, la atribución de causalidad en vacas abortadas no puede realizarse por serología a nivel individual, ya que un número importante de vacas expuestas a *N. caninum*, y por lo tanto seropositivas, no abortan. Por este motivo es necesario realizar estudios serológicos comparativos poblacionales. En este estudio, cuando comparamos los resultados entre los 3 kits ELISA utilizados a nivel general sobre las 230 muestras, se observó que para el kit 3 (BioX), el porcentaje de seropositividad fue significativamente mayor que para los kits 1 y 2, entre los cuales no se apreciaron diferencias. A nivel de cada uno de los establecimientos, el porcentaje de animales seropositivos fue superior (3/4 tambos) o igual (1/4 tambos) con el kit 3 en comparación con los otros dos kits usados, pero el riesgo del aborto y la significancia del análisis estadístico se mantuvieron en los 4 predios independientemente del kit utilizado. En Uruguay, la asociación entre seropositividad y aborto se había documentado previamente en un solo tambo, utilizando inmunofluorescencia indirecta (Kashiwazaki et al., 2004).

Varios autores reportan que el riesgo de aborto observado en vacas serológicamente positivas fue de 2 a 26 veces más alto que en las serológicamente negativas (Lopez-Gatius et al., 2004, Weston et al., 2005), datos muy semejantes a los observados en este estudio, donde los bovinos seropositivos a *N. caninum* tuvieron entre 5.13 y 36 veces más chances de tener una historia reciente de aborto que los seronegativos a este agente.

Para la investigación diagnóstica del aborto asociado a la infección por *N. caninum*, debe tenerse en cuenta cuándo y cómo realizar el muestreo de suero sanguíneo. Las muestras de este estudio fueron tomadas cerca de la ocurrencia de los abortos, cuando existe la mayor probabilidad de detectar anticuerpos anti-*N. caninum* y menores chances de detectar animales falsos negativos (Guido et al., 2016). Es necesario identificar individual e inequívocamente las vacas/vaquillonas abortadas (casos), y a efectos de comparación, un grupo de animales en riesgo de abortar (hembras preñadas), pero no abortados (controles) con similares características de los casos (pareadas por edad, periodo de la lactancia, período de gestación, origen, tipo de alimentación, etc.) (Gordis, 2015). Idealmente, la cantidad de casos a muestrear debe ser suficientemente alto como para representar la situación clínica que se desea investigar. El número de controles que se deben seleccionar por cada caso en un estudio de casos y controles es definido de acuerdo al poder estadístico en función de la prevalencia estimada de infección. Seleccionando hasta cuatro controles por cada caso, se

aumenta el poder estadístico (Ury, 1975; Gordis, 2015), sin embargo, esto también aumenta los costos analíticos, y en ocasiones con una proporción menor se alcanza un poder estadístico adecuado. En nuestro estudio, el número mínimo de casos muestreados fue de 6 animales (tambo B), y la proporción de controles:casos fue de 1:1 para el tambo B, de 2:1 para los tambos A y D, y de 4.6:1 para el tambo C. A pesar de que en el tambo B con una baja cantidad de casos muestreados y una proporción de controles:casos de 1:1 se pudo establecer una asociación estadística significativa entre seropositividad e historia de aborto con cualquiera de los 3 kits utilizados, es recomendable que el número de casos muestreados sea superior y que dicha proporción sea al menos de 2:1 y no más de 4:1 para lograr una potencia estadística adecuada (Breslow, 2014).

Los estudios de casos y controles no permiten definir la prevalencia de la enfermedad en la población en estudio, sino que se realizan para analizar la posible asociación entre un evento (en este caso aborto) y la exposición a un agente o enfermedad (en este caso, *N. caninum*) (Gordis, 2015), con el objetivo de hacer una aproximación al diagnóstico. En nuestro estudio, a pesar de que no pudimos estimar la seroprevalencia en los 4 tambos analizados, el porcentaje de seropositividad a nivel predial estuvo comprendido entre 45.2-53.5% (kit 1), 44.1-53.5% (kit 2) y 51.6-69.9% (kit 3). El porcentaje de seropositividad fue significativamente superior cuando se utilizó el kit 3, motivo por el cuál sería recomendable realizar estudios de validación regional de este kit, para ajustar el punto de corte, si fuera a usarse en futuros estudios epidemiológicos en nuestra región. El mayor porcentaje de seropositividad observado con el kit 3, podría deberse a que este kit utiliza como antígeno una proteína recombinante de *N. caninum* (NcSRS2), que se expresa tanto en los bradizoítos como en los taquizoítos del parásito (Fuchs et al., 1998), por lo que podría estar detectando anticuerpos anti-bradizoítos (animales con exposición crónica) y anti-taquizoítos (exposición más reciente). Además, Alvarez-García et al., (2013) reportaron que este kit presentó mayor número de reacciones cruzadas en relación a otros kits evaluados, lo que también podría explicar la mayor frecuencia relativa de resultados positivos con este kit.

Alvarez-García et al., (2013), en un estudio realizado en Europa, evaluaron el rendimiento de kits comerciales de ELISA para diagnóstico serológico de exposición a *N. caninum*, y observaron que, en términos de especificidad y sensibilidad, todos los kits son aptos para el diagnóstico, información que resulta esencial para los laboratorios veterinarios que los usan como herramienta diagnóstica ofrecida a veterinarios clínicos y productores agropecuarios. Otro estudio en el mismo continente realizó una evaluación Bayesiana de dos kits comerciales para el diagnóstico serológico en vacas abortadas y no abortadas, así como

de bovinos comprados de otros orígenes, los resultados demostraron una alta eficacia de ambos kits (Roelandt et al., 2015). En EEUU también fueron realizados estudios comparativos con kits de ELISA comerciales, reportando que es una técnica útil en la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* (Wapenaar et al., 2007).

En Argentina se desarrolló experimentalmente un kit de ELISA (ELISA p-38) con un antígeno nativo de 38kDa de *N. caninum*. Este kit fue evaluado y comparado con inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoblot (IB), determinándose que el ELISA-p38 es altamente preciso, con sensibilidad y especificidad relativas de 97.8 y 99.5%, respectivamente, y una concordancia excelente/casi perfecta (K= 0.93-0.99) tanto con IFI como con IB⁷. En nuestro trabajo los resultados no difieren de los reportados en la literatura para kits de ELISA comerciales (Wapenaar et al., 2007; Alvarez-García et al., 2013; Roelandt et al., 2015), observándose una concordancia moderada a fuerte entre los kits 1-2, y 2-3, y débil a moderada entre los kits 1 y 3. Los porcentajes de acuerdo entre los kits fueron buenos, y todos ellos fueron igualmente aplicables a la aproximación del diagnóstico de abortos por *N. caninum* a través de la estimación de riesgo en casos y controles. Desafortunadamente, el kit de ELISA desarrollado en Argentina no está disponible comercialmente, razón por la cual no pudo ser evaluado comparativamente con los otros kits en nuestro estudio.

Es fundamental que las pruebas diagnósticas desarrolladas y validadas en otros países sean evaluadas con un banco de muestras locales y de referencia, y que los puntos de cortes recomendados por los fabricantes sean chequeados regionalmente, porque el desempeño de estas pruebas puede estar basado en una región específica, un panel pequeño de muestras y/o en muestras originadas sólo de infecciones experimentales con una única cepa. Alvarez-García et al., (2013), reportaron que los valores de corte sugeridos por los kits de ELISA no siempre son adaptables a la región de la investigación. En dicho estudio, realizado con un banco de sueros de referencia, las pruebas que presentaron una sensibilidad y especificidad <95% fueron analizadas y ajustadas mediante curvas ROC (“receiver operating characteristics”), observándose que los puntos de corte que determinaban un resultado positivo o negativo eran distintos a los recomendados por los fabricantes.

La IFI fue considerada por muchos años el método de referencia para el diagnóstico serológico de *N. caninum*. Sin embargo, suele presentar inconvenientes de baja sensibilidad y discrepancias entre ensayos, por lo que ha sido desconsiderada como tal (Frössling et al., 2003; Campero et al., 2018). Otras desventajas son que es una técnica demandante de tiempo, que requiere de experiencia del técnico observador, la interpretación tiene cierto

grado de subjetividad y puede haber variaciones importantes entre laboratorios y entre operarios (Guido et al., 2016; Campero et al., 2018;). Por el contrario, el ELISA permite el procesamiento de una gran cantidad de muestras en un periodo corto de tiempo, y prácticamente no hay interferencia técnica (Sartor et al., 2003), variabilidad entre operarios o dificultades en la interpretación de los resultados. Por estos motivos los ELISAs comerciales han ido desplazando el uso de pruebas de IFI para el diagnóstico de rutina.

Un ensayo interlaboratorial ciego en el que participaron 8 laboratorios iberoamericanos con representantes de Argentina, Brasil, España, México y Perú, evaluó la performance de 10 pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, incluyendo 7 pruebas no comerciales de IFI, y 3 kits de ELISA, dos experimentales y uno comercial⁹; éste último es el kit 2 usado en nuestro estudio. Dicho trabajo indicó que 6 de las pruebas evaluadas tenían valores de sensibilidad o especificidad <90%, y sólo una de las pruebas de IFI tuvo un buen desempeño en términos de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva ROC, similar al de dos de los ELISAs evaluados, incluyendo el ELISA comercial (Campero et al., 2018).

En Uruguay, no hay disponibilidad de kits ELISA para detección de anticuerpos contra *N. caninum* desarrollados y producidos en el país. Los kits disponibles son importados, con costos de adquisición relativamente altos que varían entre aproximadamente US\$ 2.8 y 3.5 por muestra, a los que hay que sumarles los costos operativos. Estos altos costos muchas veces son inaccesibles para los productores bovinos, que suelen verse por tal motivo desalentados a evaluar el estatus de infección de sus rodeos. Sin embargo, el país cuenta con el aparato científico-tecnológico y empresarial necesario para el desarrollo, producción y validación de kits de ELISA a escala comercial, lo cual podría realizarse considerando que varias cepas locales de *N. caninum* fueron recientemente aisladas en este país (Cabrera et al., 2018) y podrían usarse como fuente de antígenos.

Además de la aplicabilidad del ELISA para la aproximación diagnóstica del aborto bovino, esta también representa una herramienta aplicable al monitoreo y control de la enfermedad en los rodeos, ya que permite la detección de los animales infectados, lo que ayuda a la toma de decisiones respecto de su permanencia o introducción en el rodeo de hembras destinadas a reproducción. Contar con una prueba de ELISA desarrollada y validada regionalmente ayudaría a reducir los costos y posiblemente favorecería que más productores bovinos se embarquen en la realización de estudios serológicos para establecer un diagnóstico de situación en sus rodeos, o implementar medidas de control y prevención de la neosporosis bovina.

La aplicabilidad eficiente del ELISA en la aproximación del diagnóstico de infección por *N. caninum* en asociación con el aborto en vacas, debe alentar a los grupos de investigación y laboratorios de Sudamérica a desarrollar kits que lleguen a la etapa de comercialización a un costo significativamente menor que los importados. Estas pruebas deberían pasar por etapas de validación usando bancos de sueros bovinos con estatus conocido de infección obtenidos regionalmente. De esta manera se podrá evaluar la reproducibilidad local y proporcionar resultados consistentes en la población de estudio.

CONCLUSIÓN

El enfoque serológico poblacional descrito aquí representa una herramienta útil y práctica para establecer asociaciones estadísticas entre seropositividad a *N. caninum* y aborto en rodeos de bovinos lecheros. La herramienta es particularmente útil en brotes de aborto presuntamente causados por *N. caninum* de los cuales no se pueden obtener fetos abortados para estudios de patología y microbiología. El acuerdo observado entre los 3 kits evaluados en este estudio permitió arribar a similares conclusiones seroepidemiológicas.

9. CAPÍTULO 4: ENFERMEDADES ASOCIADAS AL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SUBTIPOS 1a y 2b EN BOVINOS DE CARNE Y LECHE DEL URUGUAY

RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV, *Pestivirus*) causa pérdidas económicas significativas a la industria bovina en todo el mundo. Aunque estudios serológicos muestran que la exposición al BVDV está ampliamente difundida en los bovinos en Uruguay, las enfermedades asociadas al BVDV no se reportan en gran medida. El objetivo de este trabajo fue describir los hallazgos epidemiológicos, clínicos, patológicos y virológicos de brotes espontáneos de enfermedades asociadas al BVDV en bovinos en Uruguay. Se llevaron a cabo investigaciones de diagnóstico de 6 brotes de enfermedades espontáneas en predios de carne y leche en los departamentos de Colonia, Río Negro y Soriano entre noviembre de 2016 y abril de 2018. Las carcasas de 8 bovinos muertos naturalmente de estos brotes fueron necropsiados y sometidos a examen histológico e inmunohistoquímica para detectar el antígeno BVDV en los tejidos. La RT-qPCR y secuenciación genómica también se realizaron para identificar BVDV en los niveles de especies y subtipos. Se realizaron otras pruebas de diagnóstico auxiliares, incluidos cultivos bacterianos, caso por caso para descartar diagnósticos diferenciales basados en diagnósticos presuntivos clínico-patológicos iniciales. Los casos asociados con BVDV que se diagnosticaron en el estudio incluyeron enfermedad de las mucosas, infecciones transitorias de BVDV postnatales asociadas con salmonelosis entérica y septicémica por *Salmonella* serovar Typhimurium, bronconeumonía por *Histophilus somni*, coinfecciones del tracto urinario con *Escherichia coli* y *Streptococcus* sp., coinfección entérica con coccidios, e infecciones fetales transplacentarias y abortos con coinfección por *Neospora caninum*. BVDV-1a y BVDV-2b se identificaron en cuatro de los ocho casos. Llegamos a la conclusión de que BVDV-1a y -2b contribuyen significativamente a la enfermedad y la mortalidad en el ganado en Uruguay. Investigaciones futuras deberían estimar el impacto económico de BVDV en el sector ganadero uruguayo.

Palabras clave: Virus de la diarrea viral bovina, enfermedades infecciosas, Pestivirus, América del Sur.

INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es un virus ARN, que pertenece al género *Pestivirus*, familia Flaviviridae y se distribuye en todo el mundo (Ridpath et al., 2010). BVDV causa pérdidas económicas significativas a las industrias de bovino lechero y de carne, que se atribuyen a la morbilidad, la mortalidad, el retraso del crecimiento, la producción reducida de leche, la eliminación prematura, el rendimiento reproductivo reducido y el aumento de la aparición de otras enfermedades (Houe, 2003; Richter et al., 2017). Las dos especies de BVDV actualmente reconocidas son BVDV-1 y -2, y recientemente fueron renombradas *Pestivirus* A y B, respectivamente (Smith et al., 2017; ICVT, 2018). BVDV-1 es el más genéticamente diverso, con 21 subtipos (BVDV-1a hasta

el BVDVu) actualmente reconocidos, mientras que 4 subtipos (a – d) se han descrito para BVDV-2 (Vilcek et al., 2001; Flores et al., 2002; Deng et al., 2015; Yeşilbağ et al., 2017). Más recientemente, el virus *Pestivirus* HoBi-like se ha propuesto como una nueva especie de BVDV (BVDV-3 o *Pestivirus* H) basada en similitudes antigénicas y genéticas (Liu et al., 2009; Bauermann et al., 2012; Smith et al., 2017; ICVT, 2018;).

Los resultados clínicos de la infección por BVDV incluyen: A) infección transitoria o aguda con manifestación subclínica o clínica digestiva, respiratoria y/o septicémica caracterizada por una alta morbilidad y mortalidad variable y generalmente asociada con cepas virales no citopáticas (NCP); B) infecciones reproductivas, incluidas las infecciones por ovocitos o espermatozoides que afectan negativamente la fertilidad, o la transmisión transplacentaria que puede provocar la muerte embrionaria o fetal, momificación, aborto, anomalías congénitas, mortinatos o, si el feto sobrevive, el nacimiento de terneros con infecciones persistentes (PI), particularmente cuando los fetos son infectados por cepas NCP antes de los 4 meses de gestación; y C) enfermedad de las mucosas (EM) caracterizada por baja morbilidad y alta letalidad en animales PI, generalmente antes de los 2 años de edad. EM está asociada con la sobreinfección con un biotipo citopático (CP) que puede surgir a través de mutaciones o recombinación genómicas de la cepa viral NCP que infectan los bovinos PI (Lanyon et al., 2014; Uzal et al., 2016).

BVDV es un virus con distribución mundial (Yeşilbağ et al., 2017). BVDV-1 y -2 han sido reconocidos durante muchos años en países de América del Sur, incluso Brasil (Weber et al., 2014), Argentina (Odeón et al., 2009), Colombia (Villamil et al., 2018), Perú, Chile (Ståhl et al., 2009) y Uruguay (Maya et al., 2016), mientras que el virus tipo *Pestivirus* HoBi actualmente solo se ha identificado en Argentina (Pecora et al., 2017) y Brasil (Dias et al., 2017) en este subcontinente. En Uruguay, la primera evidencia de circulación de BVDV data de 1996 (Saizar, 1998). Un estudio serológico reveló que la exposición al BVDV está difundida en bovinos de carne en todo Uruguay (Guarino et al., 2018). Más recientemente, se exploraron infecciones activas de BVDV y especies y subtipos circulantes en rodeos bovinos con problemas reproductivos, y BVDV-1a se reveló como la especie/subtipo predominante, seguido de BVDV-1i y BVDV-2b (Maya et al., 2016).

Las descripciones clinicopatológicas de las enfermedades asociadas a BVDV en Uruguay y el impacto de estas enfermedades en los sistemas de producción bovina en el país no se encuentran en la literatura científica. Reconocer e identificar estas enfermedades en brotes de campo espontáneos es esencial para establecer programas de control para reducir sus impactos económicos a nivel regional y nacional. Este trabajo describe los hallazgos

epidemiológicos, clínicos, patológicos y virológicos en brotes de enfermedades espontáneas asociadas con infecciones por BVDV en bovinos de Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los casos

Se describen ocho casos naturales de enfermedades asociadas con BVDV (casos 1-8) durante seis brotes (brotes 1-6) en establecimientos comerciales de carne y lechería en Uruguay. Los casos se diagnosticaron entre noviembre de 2016 y abril de 2018 en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario del INIA (Plataforma de Salud Animal) en La Estanzuela, Departamento de Colonia, Uruguay. Los bovinos muertos (casos 1-8) fueron enviados para necropsia por veterinarios y productores. Además, en los casos 1 y 6, las muestras de suero recolectadas antes de la muerte por los veterinarios se pusieron a disposición para su análisis. Se recopiló información epidemiológica y clínica para cada brote cuando estuvo disponible.

Necropsia, histología e inmunohistoquímica

Los 8 bovinos murieron espontáneamente en establecimientos comerciales y posteriormente se les realizó la necropsia. Se recogieron muestras de tejido, se conservaron congeladas a -20°C para virología y se fijaron en formalina tamponada al 10% durante 48 h. Los tejidos fijados se deshidrataron, se embebieron en parafina, se seccionaron a 4-5 µm, se montaron en láminas de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina para un examen histológico de rutina.

Las secciones seleccionadas de bloques en parafina y fijadas con formalina de varios tejidos de todos los casos se procesaron para inmunohistoquímica (IHQ) para detectar el antígeno *Pestivirus* utilizando un protocolo estándar proporcionado amablemente por el Jan Shivers del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Minnesota. Brevemente, la recuperación de antígeno inducida por calor se realizó colocando las secciones desparafinizadas en una cámara de desbloqueo (Biocare Medical) a 110°C durante 30 segundos. Se aplicó un anticuerpo monoclonal anti-BVDV disponible comercialmente, el isotipo IgG_{2a} producido en ratones (catálogo D89, VMRD, Pullman, WA, E.E.U.U.) como anticuerpo primario durante 45 minutos a una dilución 1:20. Se utilizó un polímero anti-ratón marcado con peroxidasa (*HRP*)-*labeled polymer* (EnVision + HRP cabra anti-IgG de ratón, K4001, Dako) como sistema de detección, con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC # 3469, Dako) como sustrato cromógeno. Se utilizó una sección de tejido de intestino archivado de

un ternero infectado naturalmente que dio positivo para BVDV por RT-PCR e IHQ como control positivo. Para los controles negativos, las secciones en serie de todos los tejidos analizados se procesaron en paralelo como se describió anteriormente, pero el anticuerpo primario se reemplazó con suero de ratón normal (NC499L, Biocare Medical) a la misma dilución.

Virología molecular

Los ácidos nucleicos se extrajeron de suero congelado o muestras de tejido en todos los casos utilizando un kit comercial denominado QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit (QIAGEN®, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa (RT) se realizó utilizando cebadores aleatorios y la enzima Super-Script II (Invitrogen®, E.E.U.U.). Los ensayos de PCR en tiempo real dirigidos a un fragmento de 207pb de la región 5'UTR del BVDV se realizaron usando los cebadores BVDV190F y V326, y la sonda Taq-Man® TQ-Pesti como describe Hoffman et al., (2006) y Gaede et al., (2005), respectivamente, y posteriormente modificado por Maya et al., (2016), para detectar BVDV-1, BVDV-2 y el HoBi-like *Pestivirus*. Todas las PCR en tiempo real se realizaron con el kit de sonda SensiMix™ II (Bioline Reagents Ltd.) y un instrumento Rotor-Gene Q (Qiagen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Secuenciación y análisis filogenético

En todas las muestras positivas por qPCR, un fragmento de 207 pb del 5'UTR se amplificó mediante PCR convencional, utilizando el mismo par de cebadores utilizado para la qPCR. Los amplicones se secuenciaron en Macrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur) en un analizador genético ABI3730XL (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). Las secuencias se editaron con el software SeqMan (DNASTAR Lasergene), se subtipó con la herramienta BLAST de NCBI y se depositaron en la base de datos GenBank. La asignación del genotipo se realizó mediante análisis filogenético de secuencias uruguayas de 5'UTR, junto con cepas representativas de BVDV-1, BVDV-2 y HoBi-like *Pestivirus* recuperadas de GenBank. Las secuencias de nucleótidos se alinearon usando *Clustal W* implementado en el software MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajusta al conjunto de datos (parámetros Kimura 2 + gamma) se seleccionó utilizando el programa jModelTest según el Criterio de Información de Akaike (AIC; Akaike, 1974) (Posada, 2008). Se construyó un árbol filogenético mediante el método Neighbour Joining

(NJ) y se realizó el método Bootstrap de significación estadística (1000 repeticiones) utilizando la versión Mega 6.06 (Tamura et al., 2013).

Pruebas de diagnósticos auxiliares

Las investigaciones de diagnóstico en cada caso también incluyeron la realización de pruebas de laboratorio bacteriológicas, virológicas, serológicas y moleculares específicas para evaluar otros patógenos, en función de los diagnósticos presuntivos clínicos y patológicos en cada caso. La tabla suplementaria 1 (ver anexo 4) resume las pruebas de diagnóstico auxiliares realizadas en cada uno de los 8 bovinos necropsiados.

RESULTADOS

La Tabla 1 resume la información sobre los diagnósticos de las enfermedades, la fecha de confirmación del diagnóstico, la ubicación geográfica del rodeo, la raza, la explotación, la edad y las especies/subtipos de BVDV identificados en los 8 casos, y si bovinos de otros predios habían sido introducidos recientemente en los rodeos afectados. A continuación, se proporciona información epidemiológica, clínica y patológica adicional sobre cada caso/brote e interpretación de los resultados de las pruebas auxiliares y de diagnóstico (Tabla suplementaria 1; ver anexo 4).

Tabla 1: Diagnóstico de la enfermedad, fecha, ubicación geográfica del rodeo, raza y tipo de producción, edad, especie y subtipo de BVDV identificado y resultados inmunohistoquímicos para 8 casos de infección por BVDV.

Brote No. / Localización geográfica/ Fecha	Caso No.	Enfermedad diagnosticada	Raza, explotación, edad	BVDV especies-subtipo	BVDV resultado IHQ	Introducción reciente de bovinos
1 / Colonia / Nov 2016	1	Enfermedad de las mucosas	Novilla Aberdeen Angus, carne, 18 meses	BVDV-1a	Positivo	ND
2 / Río Negro / Feb 2017	2	Aborto, infección por BVDV aguda y/o transitoria, coinfección con <i>N. caninum</i>	Feto, lechería, 240–270 días de gestación	BVDV-1a	Negativo	ND
3 / Colonia / May 2017	3	Infección por BVDV aguda y/o transitoria, coinfección con <i>S. enterica</i> serotipo Typhimurium (salmonelosis entérica y septicémica)	Novilla de leche	BVDV-2b	Positivo	
	4	Infección por BVDV aguda y/o transitoria, coinfección con <i>H. somni</i> (bronconeumonía)	Novilla de leche	BVDV-2b	Positivo	Si
4 / Colonia / Junio 2017	5	Infección por BVDV aguda y/o transitoria, coinfección con <i>Streptococcus</i> sp. y <i>E. coli</i> en tracto urinario	Novillo, feed lot, 2 años	BVDV-1a	Positivo	Si
5 / Soriano / Abril 2018	6	Posible enfermedad de las mucosas o severa infección transitoria, coinfección entérica con <i>Eimeria</i> sp.	Holando, carne, 4 years	BVDV-1a	Positivo	Si
6 / Colonia / Dec 2017 y Ene 2018	7	Aborto, infección por BVDV aguda y/o transitoria	Feto, lechería, 180–210 días de gestación	BVDV-2b	Negativo	ND
	8	Aborto, infección por BVDV aguda y/o transitoria	Feto, lechería, 240–270 días de gestación	BVDV-2b	Negativo	ND

IHQ: inmunohistoquímica. ND: no determinado.

Brote 1:

El brote 1 ocurrió en un lote de 340 vaquillonas Aberdeen Angus. Doce vaquillonas murieron esporádicamente de septiembre a noviembre de 2016 (mortalidad 3,5%). El examen clínico de una novilla de 18 meses (caso 1) reveló taquipnea (120 respiraciones/minuto), taquicardia (48 latidos/minuto), una temperatura rectal de 39.5°C (normotermia), atonía ruminal, diarrea, deshidratación y pérdida de peso. El animal murió espontáneamente después de un curso clínico de 96 h.

La necropsia reveló múltiples erosiones irregulares y úlceras no perforantes de hasta 0.5 cm en la mucosa de la región torácica del esófago (Fig. 1a). Petequias y equimosis en la serosa yeyunal y contenido líquido de color marrón que se observaban también en ciego y colon. Difusamente, la mucosa del colon estaba marcadamente enrojecida, con contenidos viscosos de color marrón y sangre coagulada adherida a la superficie (colitis hemorrágica) (Fig. 1b).

Microscópicamente, se observó esofagitis ulcerativa necrotizante multifocal (Fig. 1c) con microtrombosis en la submucosa y necrosis y/o apoptosis de queratinocitos individuales, rumenitis superficial multifocal y reticulitis con edema y degeneración hidropica de queratinocitos y transmigración de neutrófilos en el epitelio. También se observó

enterotifilocolitis necrotizante extensa severa con edema submucoso, microtrombosis en la lámina propia y criptitis neutrofílica con enterocitos necróticos. La IHQ para la detección del antígeno de BVDV reveló inmunomarcación abundante, fuerte y frecuente intralesional, finamente granular y homogénea en el citoplasma del epitelio (queratinocitos y enterocitos) y células inflamatorias en el esófago (Fig. 1d), intestino delgado y colon.

El genoma de BVDV se detectó en el suero a través de RT-qPCR (ct 27.70), y el BVDV-1a se identificó adicionalmente mediante la secuenciación de la región genómica 5'UTR (GenBank MN159214). La enfermedad de la mucosa se diagnosticó con base en estos resultados (Tabla 1), mientras que otras causas de enterocolitis en el ganado, incluida *Salmonella* spp. y el coronavirus bovino, se descartaron mediante pruebas específicas (Tabla suplementaria; ver anexo 4).

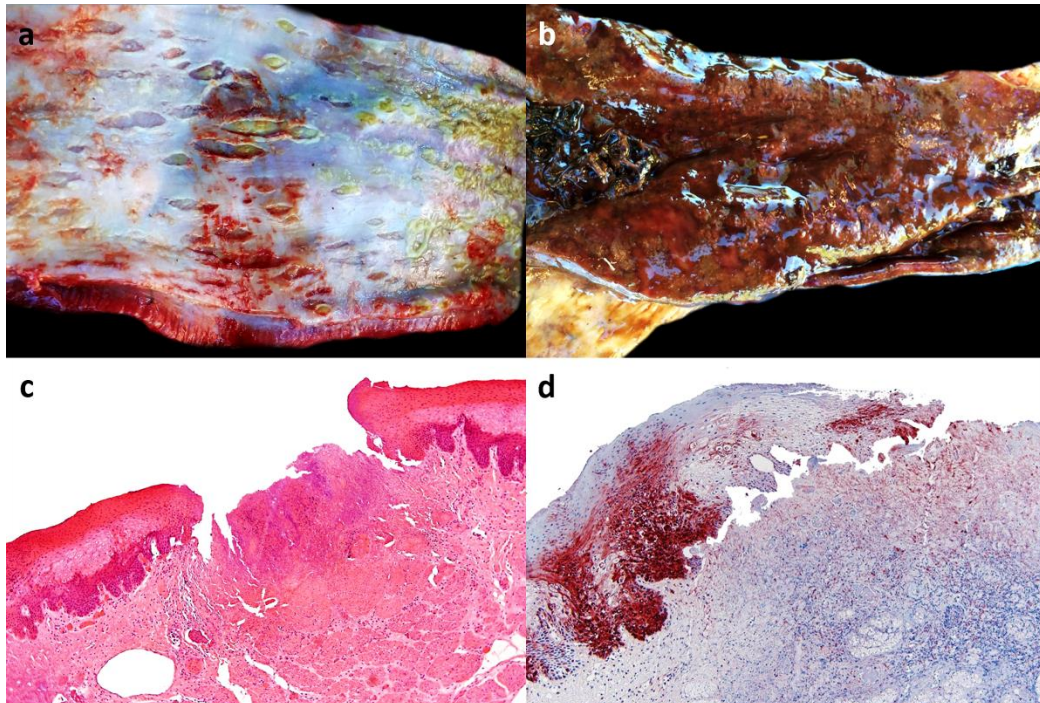


Figura 1: Hallazgos patológicos en una vaquillona Aberdeen Angus con enfermedad de las mucosas causada por BVDV-1a (caso 1). a) La mucosa del esófago muestra múltiples erosiones, coalescentes, irregulares, bien definidas y úlceras no perforantes (esofagitis ulcerosa), algunas de las cuales tienen un halo hemorrágico. b) La mucosa del colon está marcadamente enrojecida, necrótica, ulcerada y contiene escaso líquido marrón y pocos coágulos de sangre (colitis necrohémorrágica). c) Histología de la mucosa esofágica que representa una de las úlceras que se muestran en a), con necrosis subyacente de la submucosa y degeneración hidrópica de queratinocitos en el epitelio adyacente; H&E. d) inmunohistoquímica de BVDV en una sección de la lesión que se muestra en c) que denota inmunomarcación de antígeno abundante en la mucosa esofágica adyacente a la úlcera.

Brote 2:

El brote 2 ocurrió en un rodeo lechero de 1222 bovinos Holando, incluidas 580 vacas en ordeño, 40 vacas secas, 200 vaquillonas, 400 terneros y 2 toros. De 533 vacas o vaquillonas preñadas de 2 a 7 años, el 16% abortó entre 4 y 8 meses de gestación. Un feto macho (caso 2) que había sido abortado aproximadamente a los 240 días de gestación por una vaca de 5,5 años fue necropsiado.

La única lesión macroscópica fue la presencia de petequias pleurales leves en el pulmón derecho. La histología reveló encefalitis linfocítica e histiocítica necrotizante moderada, multifocal con gliosis, miocarditis linfocítica e histiocítica multifocal moderada a severa y glositis linfocítica e histiocítica multifocal discreta. Como se muestra en la tabla suplementaria 1, un procedimiento de IHQ para detectar el antígeno de *Neospora caninum* reveló inmunomarcación intralesional en el encéfalo y el corazón del feto. El genoma del protozoo se detectó por PCR en una muestra de cerebro congelado. En base a estos resultados, se determinó un diagnóstico etiológico de encefalitis y miocarditis causadas por *N. caninum*. Sin embargo, el genoma de BVDV fue detectado por RT-qPCR (ct 27.37) de un pool de tejidos fetales y luego identificado como BVDV-1a (GenBank MN159211). La inmunomarcación para el antígeno BVDV fue negativo para todos los tejidos fetales analizados (cerebro, riñón, pulmón, bazo e hígado), lo que sugiere una infección aguda (transitoria) por BVDV en lugar de un feto PI (Tabla 1).

Brote 3:

El brote 3 ocurrió en un predio dedicado a la cría de terneras y vaquillonas lecheras originarios de varios establecimientos de diferentes departamentos de Uruguay. Se registró un brote de enfermedad respiratoria en un grupo de aproximadamente 200 terneras de 3 a 4 meses de edad que habían sido llevadas al predio aproximadamente 30 días antes. El brote de enfermedad respiratoria comenzó en 20 terneras (10%) 15 días después del ingreso en el predio de recría, aproximadamente 80 animales (40%) se vieron afectados en un período de 5 días pós el inicio del brote. Las tasas de morbilidad y mortalidad fueron del 80% y del 7,5% (15 terneras), respectivamente.

Dos terneras fueron necropsiadas (casos 3 y 4). Los hallazgos patológicos en el caso 3 incluyeron neumonía intersticial fibrinosa, moderada, difusa, histiocítica y neutrofílica con bronquiolitis necrotizante, alveolitis neutrofílica multifocal y microtrombosis con pleuritis multifocal. Multifocalmente, los pulmones y los riñones mostraron vasculitis linfocítica y necrotizante segmentaria que afectó las arteriolas de tamaño mediano (Fig.

2a). Además, se observó tiflocolitis erosiva multifocal moderada con criptitis necrotizante, con infiltrado inflamatorio extendido a la submucosa, junto con linfadenitis mesentérica fibrinosa y abomasitis linfocítica y neutrofílica multifocal moderada. También se observaron hepatitis portal linfocítica, histiocítica y neutrofílica portal difusa, leve, con colestasis en los conductos biliares y hepatitis histiocítica y neutrofílica necrosante aleatoria multifocal mínima en todo el parénquima.

Salmonella enterica serotipo Typhimurium se aisló del ganglio linfático mesentérico y de los intestinos, mientras que se descartó el coronavirus bovino y varios virus que causan neumonía (ver tabla suplementaria 1). El BVDV se identificó mediante RT-qPCR (ct 27.35) de un pool de órganos congelados y se caracterizó como BVDV-2b por secuenciación (GenBank MN159205). La IHQ para la detección del antígeno BVDV en el pulmón reveló inmunomarcación finamente granular, homogénea y focal en el citoplasma del músculo liso y las células endoteliales de una arteriola afectada por arteriolitis y macrófagos infiltrantes (Fig. 2b). No se produjo inmunomarcación en los tejidos de riñón, intestino delgado, colon o hígado. En base a estos resultados, diagnosticamos salmonelosis entérica y septicémica en coinfección con BVDV-2b (Tabla 1), que fue detectado por IHQ dentro de las lesiones arteriolares en el pulmón y, por lo tanto, se sospechaba que causaba la arteriolitis.

El caso 4 del mismo brote tuvo hallazgos patológicos que incluyeron bronconeumonía fibrinosupurativa, extensa, grave que afectaba aproximadamente al 70% del parénquima pulmonar y pleuritis fibrinosa. La lengua mostró necrosis multifocal de queratinocitos en la mucosa y apoptosis multifocal de queratinocitos individuales en el esófago y el rumen.

Histophilus somni fue aislado del pulmón y se descartaron las causas virales de neumonía (Tabla suplementaria 1). Se identificó BVDV en una muestra congelada de pool de órganos por RT-qPCR (ct 26.08), y la secuenciación del genoma reveló el mismo subtipo que en el caso 3 de este brote (GenBank MN159204). La IHQ para el antígeno BVDV reveló inmunomarcación intralesional focal en el epitelio de la mucosa basal de la lengua, en el citoplasma de las células endoteliales y musculares de los vasos sanguíneos en los pulmones y en los macrófagos que se infiltran en la pleura y el intersticio. No se encontró inmunomarcación en los tejidos de riñón, ganglio linfático, corazón, intestino o rumen. Se diagnosticó bronconeumonía por *H. somni* (tabla 1) en coinfección con BVDV-2b que fue detectado por IHQ en las lesiones pulmonares y linguales.

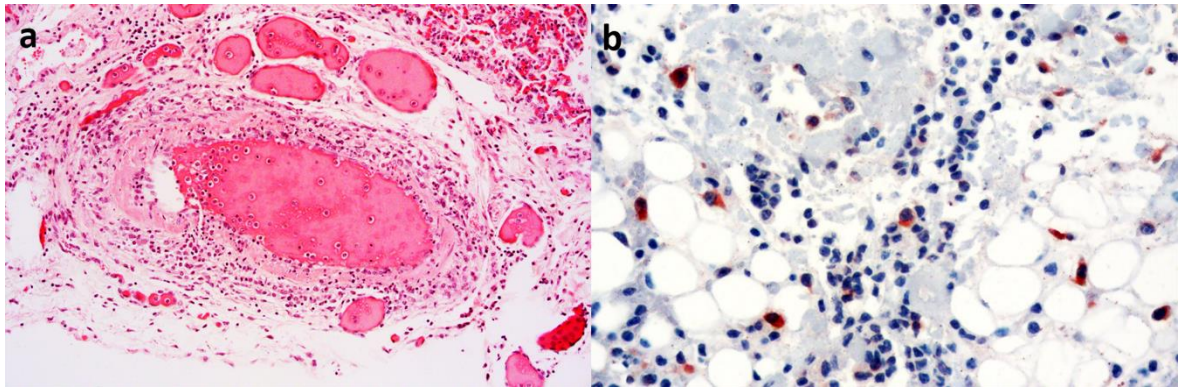


Figura 2: Lesiones microscópicas en el pulmón de una vaquillona Holando con infección transitoria por BVDV-2b (caso 3). a) Las células inflamatorias se infiltran en la túnica media de una arteriola de tamaño mediano en el intersticio pulmonar (arteriolitis); H&E. b) Inmunohistoquímica de BVDV que revela inmunomarcación granular intracitoplasmático en macrófagos que se infiltran en el intersticio pulmonar (pleura).

Brote 4:

El brote 4 ocurrió en un piquete de engorda de novillos con aproximadamente 300 animales de carne de diferentes orígenes. Un novillo de carne de raza indeterminada de aproximadamente 2 años (caso 5) presentó inapetencia y dejó de beber agua. El tratamiento con antibióticos (penicilina G procaína y dihidroestreptomicina) se administró durante 5 días; sin embargo, el novillo murió después de un curso clínico de 10 días. En 6 meses, otros dos novillos con presentaciones clínicas similares murieron, lo que determina una tasa de mortalidad del 1%.

El veterinario realizó una necropsia parcial y algunos órganos, incluidos el riñón, el corazón, el hígado, la vejiga urinaria y el intestino delgado y grueso, se enviaron al laboratorio de diagnóstico. Los hallazgos patológicos en los riñones incluyeron necrosis coagulativa cortical extensa (infartos renales) (Fig. 3a) y arteriolitis segmentaria necrotizante ocasional con trombosis (Fig. 3b). También se observó necrosis transmural severa, urocistitis fibrinosupurativa y hemorrágica con trombosis y necrosis individual de leiomiocitos arteriolares. Además, se observó colitis leve aguda focal con criptitis necrotizante.

Se detectó BVDV por RT-qPCR (ct 34.04) del pool de órganos congelados y se identificó adicionalmente como BVDV-1a mediante secuenciación (GenBank MN159221). La IHQ para la detección del antígeno BVDV mostró inmunomarcación citoplasmática multifocal e infrecuente en macrófagos que se infiltran en la mucosa de la vejiga urinaria; no se observó marcación en ningún otro tejido analizado (hígado, riñón, bazo, pulmón y colon). Además, en este caso, *Streptococcus* sp. se aisló del riñón y *Escherichia coli* se aisló del riñón, de la vejiga urinaria y del hígado (Tabla suplementaria 1). Estos se consideraron

posibles patógenos secundarios oportunistas. Debido a que la IHQ para BVDV fue negativo en múltiples tejidos, excepto en la vejiga, se sospechó una infección aguda (transitoria) por BVDV-1a.

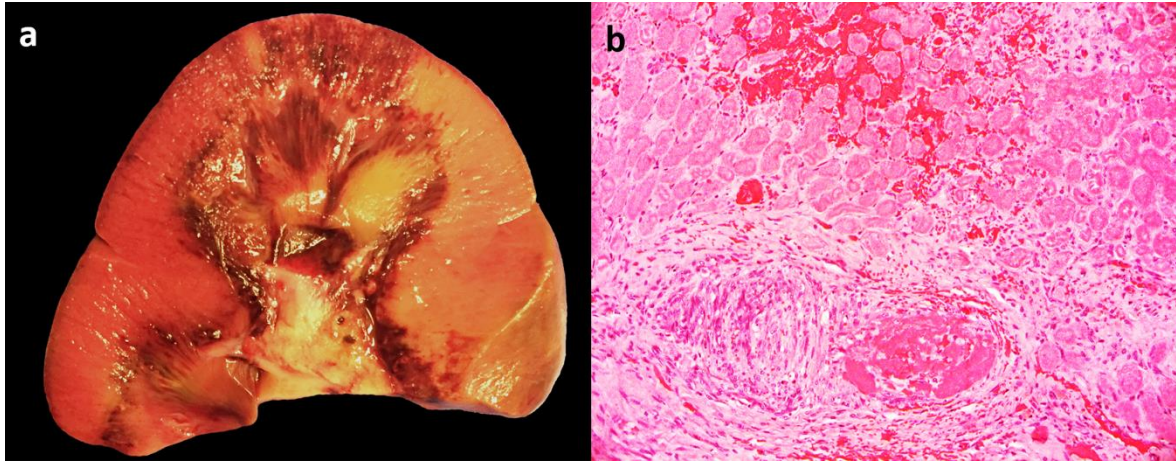


Figura 3: Lesiones renales en un novillo de carne infectado con BVDV-1a (caso 5). a) Una sección de riñón muestra infartos renales corticales multifocales. b) Microscopía del riñón afectado que muestra arteriolitis severa con trombosis (parte inferior) y necrosis coagulativa extensa de los túbulos renales corticales adyacentes con hemorragia intersticial (infarto agudo); H&E.

Brote 5:

El brote 5 ocurrió en un establecimiento de cría de terneros y engorde de novillos, con 708 bovinos de diferentes razas y orígenes. Entre enero y abril de 2018, 12 novillos Holando (1,7%) presentaron emaciación, anorexia, aislamiento y diarrea y murieron después de un curso clínico de 1 mes. Se realizó necropsia a un novillo Holando de aproximadamente 4 años (caso 6) en mal estado corporal.

El examen patológico reveló una enteropatía crónica que afectaba el íleon y el colon, caracterizada por depleción de las glándulas intestinales y criptas en la mucosa, ocasionalmente criptitis neutrofílica y necrotizante y coccidios intraepiteliales infrecuentes, morfológicamente compatibles con *Eimeria* spp. Además, se observó nefritis intersticial linfocítica crónica, moderada, multifocal, así como pleuritis moderada con fibrosis pleural y neumonía intersticial fibrosante y linfadenitis supurativa moderada de etiología indeterminada.

La IHQ para BVDV reveló un inmunomarcación fuerte y abundante intracitoplasmática finamente granular y homogénea en las células epiteliales, que era difuso en todos los tejidos examinados (pulmón, intestino, hígado y riñón). Se detectó BVDV en el suero por RT-qPCR (ct 28.75), y BVDV-1a se identificó por secuenciación (GenBank

MN186041). Se descartaron otras causas de enterocolitis, incluidas *Salmonella* spp., *Mycobacterium avium paratuberculosis*, coronavirus bovino y rotavirus del grupo A (Tabla complementaria 1). Con base en los resultados generales, probablemente este caso se trataba de un ternero PI con BVDV-1a o con una infección transitoria severa.

Brote 6:

El brote 6 ocurrió en una propiedad lechera con el tamaño del rodeo desconocido, donde se registró un aumento en la tasa de abortos. Dos fetos Holando abortados (casos 7 y 8) de aproximadamente 180-210 días de gestación fueron necropsiados. Para el caso 7, la investigación de diagnóstico no permitió determinar la causa del aborto porque el feto no presentaba lesiones, y todas las pruebas de diagnóstico complementarias fueron negativas (Tabla suplementaria 1) excepto el RT-qPCR para BVDV (ct 32.17), que fue positivo en un pool de órganos fetales.

En el caso 8, el examen histológico reveló encefalitis necrotizante, linfohistiocítica, multifocal, moderada, hepatitis necrotizante multifocal aleatoria severa, miocarditis linfocítica multifocal moderada y placentitis linfohistiocítica multifocal con necrosis trofoblástica. Todas las lesiones fueron altamente compatibles con la neosporosis. *Neospora caninum* fue detectado intralesionalmente por IHQ en el cerebro y por PCR en el mismo tejido (Tabla suplementaria 1). Se detectó BVDV por RT-qPCR (ct 33.90) en pool de órganos fetales.

Se identificó BVDV-2b en ambos fetos por secuenciación (GenBank MN186039 y MN186040). La IHQ para la detección del antígeno BVDV fue negativa en los tejidos de ambos fetos, incluyendo el cerebro, los pulmones y el bazo en el caso 7 y el cerebro, los riñones, el hígado y el bazo en el caso 8. Según estos resultados, infecciones agudas/transitorias por BVDV, en lugar de PI, se sospecharon en ambos casos (tabla 1).

Análisis filogenético

Como se muestra en la Fig. 4, el análisis filogenético reveló que 4 de las cepas eran BVDV-1a y las otras 4 BVDV-2b con valores de *bootstrap* de 71% y 63%, respectivamente.

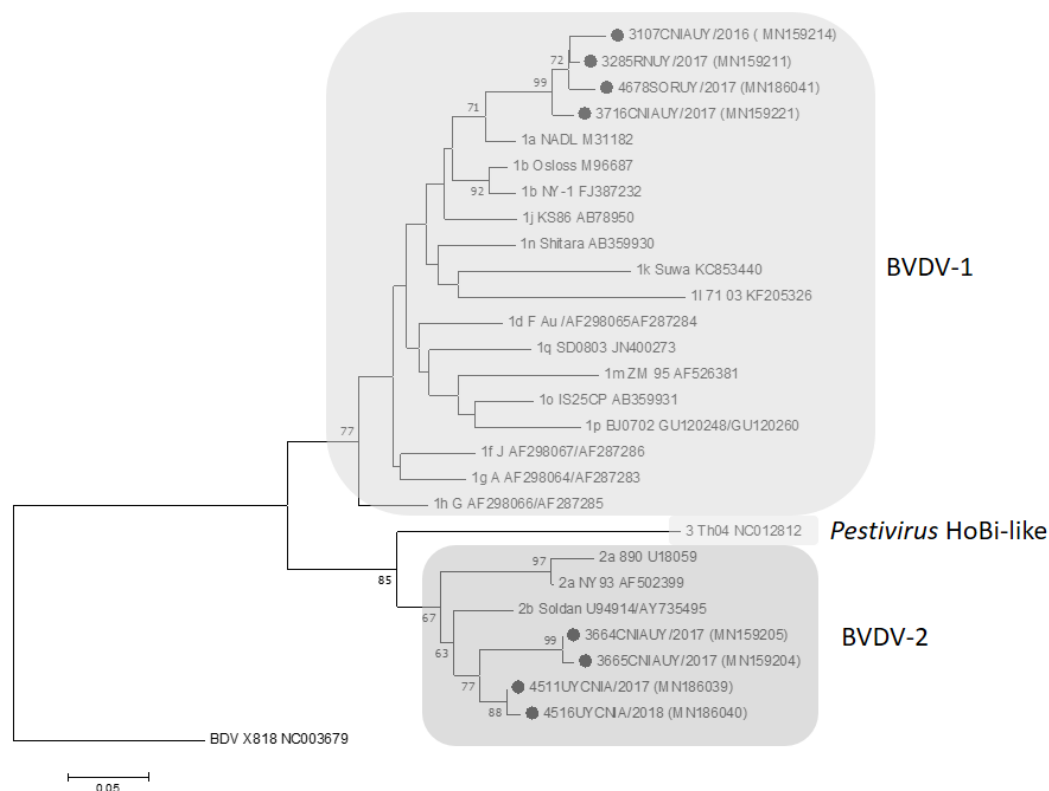


Figura 4: Árbol filogenético construido por el método Neighbor Joining utilizando 207 nt de los 5'UTR del genoma BVDV. Las cepas uruguayas están indicadas por puntos negros. Las secuencias de referencia de las especies BVDV-1, BVDV-2 y HoBi-like *Pestivirus* se recuperaron de Genbank para fines de comparación. Una secuencia del Border disease virus (BDV) se incluyó en el análisis como un grupo externo.

DISCUSIÓN

Los diagnósticos de infección por BVDV en los 8 casos informados aquí se basaron en la detección del genoma viral por RT-qPCR, junto con exámenes patológicos detallados para caracterizar las lesiones y la IHQ para identificar el antígeno BVDV en los tejidos de los bovinos necropsiados. El subtipo BVDV involucrado en todos los casos se identificó mediante la secuenciación de la región genómica 5'UTR. Se realizaron pruebas auxiliares para identificar coinfecciones y descartar diagnósticos diferenciales caso por caso (Tabla suplementaria 1; ver anexo 4). Las investigaciones de diagnóstico en los 8 casos fueron compatibles con diferentes resultados de infección por BVDV, incluyendo EM (caso 1 y eventualmente caso 6), transmisión transplacentaria con posible infección fetal transitoria/aguda (casos 2, 7 y 8), infecciones postnatales agudas (transitorias) asociadas con coinfecciones por bacterias patógenas, como *Salmonella* Typhimurium (caso 3) e *Histophilus somni* (caso 4), o bacterias oportunistas, como *Streptococcus* sp. y *E. coli* (caso 5), o eventual infección transitoria severa asociada con coccidios entéricos (caso 6).

Los signos clínicos y los hallazgos patológicos en la vaquillona del brote 1 fueron los que se describen típicamente en la literatura para casos de EM (Brodersen, 2014; Uzal et al., 2016). La detección del genoma viral y la localización del antígeno BVDV intralesionalmente por IHQ confirmaron el diagnóstico etiológico, mientras que otras causas de colitis necrotizante, como *Salmonella* spp. y el coronavirus bovino, se descartaron (Uzal et al., 2016).

Para la observación de caso de EM se requiere la presencia de animales PI infectados congénitamente con BVDV, que son la principal fuente de infecciones en los rodeos. Los bovinos PI son transmisores virales de por vida e inmunotolerantes a la cepa NCP con la que están infectados porque sus sistemas inmunes no reconocen los antígenos BVDV como extraños, lo que lleva a una replicación viral extensa en las células (Brodersen, 2014; Uzal et al. 2016). En nuestro caso, se confirmó la viremia identificando BVDV-1a en el suero, mientras que la IHQ permitió detectar abundante antígeno viral en los tejidos del esófago, intestino delgado y grueso, que mostraron lesiones típicas de EM. La EM se produce en animales PI cuando la cepa NCP BVDV se convierte en el biotipo citopático mediante mutación, recombinación y/o reordenamientos genómicos. En general, la proteasa viral NS2/3 que contiene la cepa NCP se divide en NS2 y NS3 en las cepas citopáticas (Peterhans et al., 2003; Lanyon et al., 2014). Esto da como resultado una infección devastadora que destruye las células huésped, a las cuales el sistema inmune del animal no puede responder (Uzal et al., 2016).

Los terneros PI recién nacidos pueden ser clínicamente normales, débiles, nacer más pequeños de lo normal o mostrar retraso en el crecimiento; sin embargo, la mayoría muere de EM antes de los 2 años (Lanyon et al., 2014; Uzal et al., 2016), que es el mismo rango de edad de la vaquillona con EM en el caso 1. El novillo de 4 años en el brote 5 (caso 6) presentó histología intestinal severa lesiones compatibles con EM, aunque no se observaron lesiones macroscópicas típicas de EM en el tracto digestivo. Esto refuerza la idea de que los animales PI pueden permanecer asintomáticos en los rodeos durante más de dos años, perpetuando la infección y la enfermedad. En los bovinos PI, la IHQ debe mostrar una inmunomarcación fuerte en todos o la mayoría de los tejidos y órganos, ya que la infección en estos animales es diseminada, y los tejidos generalmente contienen altas cargas virales (Bielefeldt-Ohmann et al., 2008). La fuerte inmunomarcación intra y extralesional generalizada en los pulmones, intestinos, hígado y riñones del caso 6, junto con el genoma viral detectado en el suero, indicaron que este novillo era virémico y probablemente representaba un animal PI.

Las respuestas fetales a la infección por BVDV están influenciadas principalmente por la edad gestacional, la respuesta inmune fetal y el biotipo y subtipo viral (Bielefeldt-Ohmann et al., 2008; Kelling & Topliff, 2013). Los abortos a los 6-8 meses de gestación identificados como casos 2 y 8 probablemente fueron causados por *N. caninum* dada la naturaleza de las lesiones fetales, que eran típicas de este protozoo, y su detección intralesional a través de IHQ en el cerebro y miocardio, así como por PCR en el cerebro en ambos casos. Sin embargo, las coinfecciones con BVDV-1a (caso 2) y BVDV-2b (caso 8) se identificaron mediante RT-qPCR y secuenciación, lo que indica una circulación transplacentaria y la transmisión de ambas especies y subtipos virales en estos fetos. Debido a que los fetos infectados con cepas de BVDV NCP antes del cuarto mes de gestación generalmente son inmunotolerantes al virus y, por lo tanto, desarrollan infecciones persistentes, la carga viral en los tejidos fetales de PI generalmente es alta y detectable por IHQ (Bielefeldt-Ohmann et al., 2008). Por el contrario, en nuestros fetos (casos 2, 7 y 8), el virus no fue detectado por IHQ, aunque fue identificado por RT-qPCR, lo que sugiere que la carga viral puede haber estado por debajo del límite de detección de IHQ e indirectamente sugiere que en estos fetos las infecciones fueron agudas (transitoria). No se pudo determinar el papel de las infecciones por BVDV-1a y BVDV-2b como causas de abortos en estos casos. Curiosamente, en un estudio realizado en ganado lechero, se supuso que la inmunosupresión inducida por BVDV contribuía a la ocurrencia de abortos debido a *N. caninum* (Björkman et al., 2000), aunque se necesitan investigaciones más detalladas para confirmar la posible asociación sinérgica entre estos agentes (Quinn et al., 2004).

Los fetos que sobreviven a las infecciones por cepas NCP de BVDV antes del día 90, y más raramente hasta el día 125 de gestación, desarrollan inmunotolerancia al virus y nacen PI (Grooms, 2004). Se reporta que la inmunotolerancia está mediada por la capacidad del virus para inhibir la producción de interferón tipo I en las células fetales infectadas, permitiendo que la infección persista (Charleston et al., 2001). Sin embargo, dependiendo de la edad gestacional y la cepa viral, la infección transplacentaria también puede provocar la muerte embrionaria o fetal, causando reabsorción, momificación, aborto, malformaciones congénitas o nacimiento de terneros clínicamente sanos (Moennig & Liess, 1995; Kelling & Topliff, 2013).

El subtipo de BVDV del feto del caso 2 (brote 2) identificó BVDV-1a, mientras que para los fetos del caso 7 y 8 (brote 6), el subtipo identificado fue el BVDV-2b. Bielefeldt-Ohmann et al. (2008) informaron que tanto BVDV-2 como BVDV-1b tienen un tropismo tisular similar, aunque BVDV-2 atraviesa la placenta más rápidamente. Además, la

inmunomarcación antigénica en los tejidos fetales fue más intenso para BVDV-2 que para BVDV-1b (Bielefeldt-Ohmann et al., 2008). En los 3 fetos evaluados en nuestro estudio, la IHQ para BVDV fue negativa en todos los tejidos analizados, independientemente de la especie y subtipo viral infectante. Este hallazgo sugiere que los fetos no eran PI, sino que estaban infectados de forma aguda (transitoria), lo que puede haber contribuido o no al aborto debido a *N. caninum* en los casos 2 y 8 como se discutió anteriormente. Cuando la infección ocurre en el último tercio de la gestación, el sistema inmune fetal bovino está suficientemente desarrollado para responder al virus, siendo comparable con una infección postnatal transitoria (Baker, 1995; Moennig & Liess, 1995). En nuestro estudio no se realizaron ensayos serológicos para evaluar si estos fetos habían desarrollado respuestas humorales específicas al BVDV.

Las infecciones por BVDV agudas (transitoria) son en gran parte subclínicas o causan signos clínicos leves, aunque pueden inducir leucopenia (linfopenia, monocitopenia) y reducir la producción de anticuerpos y la liberación y función de neutrófilos, lo que resulta en inmunosupresión. Dicha inmunosupresión favorece las infecciones bacterianas y/o virales secundarias (Uzal et al., 2016) que pueden contribuir a enfermedades respiratorias, digestivas o septicémicas (Fulton et al., 2000; Uzal et al., 2016). En los tres animales de los brotes 3 y 4 (casos 3 a 5), la infección por BVDV probablemente contribuyó a la aparición de histophilosis neumónica (caso 3), salmonelosis entérica y septicémica (caso 4) y septicemia o infección urinaria por patógenos oportunistas como *Streptococcus* sp. y *E. coli* (caso 5). Estas coinfecciones se confirmaron aislando los agentes bacterianos involucrados en cada caso, y su papel patogénico se estableció evaluando las lesiones compatibles con las causadas por estos agentes en los respectivos exámenes patológicos.

La adquisición de animales sin verificar su “*estatus* de infección por BVDV es un factor de riesgo importante para la infección por este virus en rodeos bovinos. Esto está directamente relacionado con la introducción de animales PI que pueden transmitir la infección o nuevas cepas virales a los rodeos (Solis-Calderon et al., 2005; Luzzago et al., 2008; Talafha et al., 2009; Saa et al., 2012). En 3 de los brotes reportados aquí (brotes 3–5), la información anamnésica reveló que los bovinos de diferentes orígenes se introdujeron y se mezclaron en los rodeos sin pruebas previas de BVDV, lo que posiblemente contribuyó a diseminar y propagar infecciones y enfermedades entre predios. Detectar y eliminar el ganado infectado de los rodeos es clave para controlar las infecciones por BVDV.

El BVDV-2 generalmente se considera más virulento y frecuentemente se relaciona con enfermedad y causan la muerte (Baker, 1995; Fulton et al., 2000). Sin embargo, en un

estudio realizado en los E.E.U.U., tanto el BVDV-1 como el -2 fueron diagnosticados en bovinos con manifestaciones clínicas respiratorias y digestivas, así como en bovinos necropsiados (Fulton et al., 2000), siendo BVDV-1 la especie más común (Fulton et al., 2000; Fulton et al., 2005) BVDV-1a (casos 1, 5 y 6) y BVDV-2b (casos 3 y 4) se identificaron en vaquillonas y novillos en nuestro trabajo, lo que indica que ambas especies están relacionadas con la morbilidad y mortalidad posnatal en bovinos en Uruguay. En otros países de América del Sur, se ha informado enfermedad clínica para BVDV-1a, -1b, -2a y -2b en Argentina (Odeón et al., 2003; González et al., 2012; Pecora et al., 2014), BVDV-1b -1d, -1i y -2b en Brasil (Lunardi et al., 2008; Santos et al., 2011; Bianchi et al., 2017; Mósená et al., 2017) y BVDV-1a, -1b y -1c en Chile y Perú (Pizarro-Lucero et al., 2006; Stahl et al., 2009).

Aunque el ternero expuesto al BVDV en el útero constituye una parte significativa de las presentaciones clínicas, los casos de infección postnatal aguda pueden ser fuentes significativas de pérdidas directas (Ridpath et al., 2010). Varias de las muertes reportadas en los brotes 3 y 4 (casos 3-5) probablemente se debieron a infecciones agudas (transitoria) de BVDV agravadas por infecciones bacterianas secundarias. La arteriolitis observada en el caso 3 es una lesión que se encuentra con frecuencia en los casos de BVDV (Uzal et al., 2016), mientras que no es un hallazgo típico en la salmonelosis (Pecoraro et al., 2017), el agente con el que se coinfectó esta ternera. Este caso presentó lesiones típicas de ambos agentes, y aunque *Salmonella* Typhimurium puede causar enfermedad y muerte por sí misma, también se comporta como un patógeno oportunista y, por lo tanto, en este caso, el BVDV puede haber predisuesto a la salmonelosis clínica. La evidencia adicional de infección aguda (transitoria) en estos casos incluyó la detección de antígenos intralesionales de BVDV por IHQ en solo algunos de los tejidos de la ternera.

La IHQ realizada en este estudio utilizó un anticuerpo primario monoclonal comercial contra la glucoproteína 55 del BVDV (glucoproteína E2 de la envoltura) fabricado con la cepa BVDV NADL. Aunque este anticuerpo se une y reacciona de forma cruzada con la mayoría de las cepas de BVDV, no se une a algunas cepas (como el Oregon C24V utilizado para producir vacunas en los E.E.U.U.) según el fabricante y la información publicada (Vickers & Minocha, 1990). La principal glucoproteína E2 es la glucoproteína más variable e inmunodominante en BVDV, y como tal, algunas cepas pueden no unirse a este anticuerpo (Kalaycioglu et al., 2012). Nuestros resultados indicaron que este procedimiento permitió identificar al menos cuatro cepas de campo uruguayas: tres cepas de BVDV-1a de los brotes 1, 4 y 5, y una cepa de BVDV-2b del brote 3. Sin embargo, se deben

realizar estudios adicionales de neutralización cruzada para evaluar si este anticuerpo reacciona de forma cruzada con otras cepas locales de BVDV de campo, ya que se ha identificado que la reactividad reducida de los anticuerpos anti-BVDV causa falla en la detección de los aislados de campo (particularmente BVDV-2a) (Yan et al., 2016).

En Uruguay, un estudio serológico realizado en bovinos de carne en 2000-2001 indicó que el 69% de 6358 animales eran seropositivos y que el 100% de 230 rebaños tenían al menos un animal seropositivo (Guarino et al., 2008). Incluso con una alta circulación viral en la población bovina del país, solo el 3% de los agricultores implementan vacunas preventivas (Guarino et al., 2008). Más recientemente, se exploraron infecciones activas de BVDV en bovinos en Uruguay en un estudio en el que se analizaron 390 muestras de suero de 14 rodeos para buscar antígenos virales mediante ELISA de captura y para genomas virales mediante RT-qPCR. Dieciséis (4,1%) de estos animales fueron positivos por ambas técnicas (Maya et al., 2016), lo que sugiere que eran animales PI y/o infecciones agudas adquiridas postnatalmente. Curiosamente, la tasa de mortalidad fue del 3.5% en el rodeo con EM del brote 1 en nuestro estudio, lo que sugiere, hipotéticamente, que el 3.5% de los animales de este rodeo podrían haber sido animales PI, un valor cercano al encontrado por Maya et al. (Maya et al., 2016). Aunque la prevalencia de los animales PI en un rodeo es generalmente menor al 2%, puede llegar al 25-30% en rebaños donde muchas vacas y/o vaquillonas estuvieron expuestas a cepas de NCP BVDV durante la gestación (Uzal et al., 2016).

El único estudio publicado para explorar la diversidad genética de BVDV en Uruguay encontró que la especie y subtipo principal era BVDV-1a (Maya et al., 2016). Casualmente, este subtipo se encontró en el caso de EM (brote 1) y en los brotes 2, 4 y 5 descritos aquí, lo que indica que, además de ser frecuente, este subtipo está asociado con enfermedades y muerte en el ganado, lo que no tiene precedentes en Uruguay en la literatura científica. Según nuestros resultados, BVDV-2b también puede considerarse como una causa importante de enfermedad en Uruguay. Además, este trabajo amplía la distribución geográfica (sur) y el biotipo de bovinos infectado (lecheros) en Uruguay para BVDV-2b, ya que este subtipo se había detectado anteriormente solo en un bovino de carne en el departamento de Rivera, en el norte de Uruguay (Maya et al., 2016).

Las vacunas disponibles comercialmente para la prevención del BVDV en Uruguay se fabrican con virus inactivado y solo pueden proporcionar protección parcial, a diferencia de las vacunas vivas modificadas utilizadas en otras regiones (Newcomer et al., 2017), incluyendo países sudamericanos como Brasil (Boehringer Ingelheim, 2018).

Investigaciones recientes en Argentina han llevado al desarrollo de una vacuna de subunidad de BVDV expresada en un baculovirus, basada en una glucoproteína E2 fusionada a un anticuerpo de cadena sencilla que se dirige a las células presentadoras de antígeno (Pecora et al., 2015). La inmunogenicidad de esta vacuna se probó en cobayas y bovinos, y el ganado inmunizado desarrolló altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra BVDV hasta un año después de la inmunización. Sobre la base de estos resultados, la vacuna se registró y se comercializa como la primera vacuna de subunidad argentina para los bovinos (Vetanco, 2019). Queda por abordar si estas vacunas protegen contra las cepas uruguayas de BVDV.

CONCLUSIONES

El BVDV está asociado con enfermedades y mortalidad en bovinos de carne y leche en Uruguay. Se necesitan estudios más extensos y sistemáticos para determinar los efectos epidemiológicos y económicos del BVDV para los bovinos en Uruguay, así como la distribución y frecuencia de las diferentes especies/subtipos involucrados con casos clínicos. Los análisis de costo-beneficio y los estudios de factibilidad podrían ayudar a establecer programas preventivos y de control para BVDV a nivel de rodeos, regional y nacional.

10. CAPÍTULO 5: DETECCIÓN DE *Tritrichomonas foetus* POR PCR EN ESMEGMA PREPUCCIAL DE TOROS EN URUGUAY

RESUMEN

La tricomoniasis bovina es una enfermedad venérea causada por *Tritrichomonas foetus*, responsable de pérdidas económicas principalmente por infertilidad y aborto en vacas y vaquillonas. El diagnóstico se basa en el cultivo del protozoario y/o su detección por técnicas moleculares. En Uruguay el reporte más reciente del parásito data de 2005 en un feto bovino abortado. El objetivo de este trabajo es comunicar la detección de *T. foetus* en esmegma prepucial de toros de Uruguay. Se evaluaron 310 muestras de esmegma prepucial de 121 toros de tambos y 189 toros de sistemas productivos de carne, mediante PCR y cultivo para *T. foetus*. Los animales provenían de 56 establecimientos (32 lecheros, 29 carniceros y 5 mixtos) distribuidos en 12 departamentos. En 2,25% (7/310) de las muestras se identificó *T. foetus* por PCR seguida de secuenciación genómica de los amplicones para la confirmación, mientras que ninguna muestra fue positiva por cultivo. Se observó un 5% (6/121) de positivos en los animales destinados a la producción lechera, todos ellos provenían del mismo establecimiento. El ADN del parásito se detectó en 1 (0,5%) de los 189 toros de carne que se analizaron. El 3,4% (1/29) y 3,1% (1/32) de los establecimientos evaluados que tenían toros de carne y leche, respectivamente, fueron positivos a *T. foetus*. La PCR permite la detección de ADN de *T. foetus* en muestras prepuciales de toros negativas por cultivo. La infección por *T. foetus* podría estar subestimada debido al uso del cultivo como único método de diagnóstico.

Palabras clave: enfermedad venérea, PCR, tricomoniasis bovina, *Tritrichomonas foetus*, Uruguay

INTRODUCCIÓN

La tricomoniasis bovina es una enfermedad venérea causada por el protozoario extracelular flagelado móvil *Tritrichomonas foetus* (Rae & Crews, 2006). La enfermedad está mundialmente distribuida (Yao, 2013), principalmente en regiones que utilizan la monta natural como manejo reproductivo (Rae & Crews, 2006).

Los toros son portadores asintomáticos y diseminadores del protozoario. La transmisión ocurre principalmente en el momento del coito, aunque también puede ocurrir por inseminación artificial (IA) ya que *T. foetus* puede permanecer viable en semen criopreservado (Egleasome & Garcia, 1992). El parásito se aloja en las criptas prepuciales y en la mucosa peneana de los toros sin afectar la libido (BonDurant, 2005). En condiciones *in vitro* el parásito altera la motilidad progresiva de los espermatozoides, lo que sugiere una posible influencia negativa en la calidad seminal (Ribeiro et al., 2010).

La enfermedad afecta directamente el desempeño reproductivo de las hembras, pudiendo obtenerse entre 45,3% y 57% de vacas no preñadas al final del servicio y, consecuentemente, una reducción del 14% al 50% de la cantidad de terneros al pie de las

madres (Ondrak, 2016). Esto se debe a que la infección en vacas y vaquillonas suele resultar en infertilidad, muerte embrionaria, piometra poscoital, aborto o maceración fetal (BonDurant, 2005; Ondrak, 2016; Rae & Crews, 2006). Se ha estimado que las pérdidas por vaca infectada con *T. foetus* en lecherías de California, EEUU, han alcanzado los US\$665 (Goodger & Skirrow, 1986). No se reportan en países de Sudamérica estimaciones del impacto económico de esta enfermedad.

Teniendo en cuenta el hábitat de *T. foetus*, el diagnóstico de tricomoniasis bovina se ha basado en el cultivo microbiológico y la examinación microscópica de muestras clínicas de esmegma prepucial de toros (Clark & Diamond, 2002; Schonmann et al., 1994). Cuando se producen pérdidas gestacionales, el mucus cervicovaginal de vacas/vaquillonas afectadas, y los órganos y fluidos de los fetos abortados representan muestras adecuadas para el diagnóstico (Bondurant, 2005).

Tritrichomonas foetus también puede ser detectada mediante amplificación de secuencias de ADN ribosomal por PCR convencional con cebadores específicos que permiten la amplificación del gen 5.8S y secuencias ITS1 e ITS2 del parásito (Felleisen et al., 1998). También se han desarrollado protocolos de PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) que proporcionan además de alta especificidad, una alta sensibilidad (McMillen & Lew, 2006), aunque este último abordaje es más costoso que la PCR convencional (Oyhenart, 2018).

La tricomoniasis bovina está reportada en Argentina como una enfermedad persistente en los establecimientos, con una prevalencia predial que varía del 3% al 19,4% en diferentes regiones del país (Molina et al., 2018; Rojas et al., 2011; Suárez et al., 2008). En la provincia de La Pampa se implementó, primero en forma voluntaria y actualmente de forma obligatoria, el Programa Provincial de Control y Erradicación de enfermedades venéreas bovinas (tricomoniasis bovina y campilobacteriosis genital bovina). Este programa demostró ser eficaz, reduciendo la prevalencia predial de estas enfermedades de aproximadamente 10% a 3% en un período de 7 años (2007-2014) (Molina et al., 2018b). En Brasil, considerando distintos estudios regionales, la prevalencia a nivel de rodeos de tricomoniasis bovina es de 1,88% a 66,7% (Alves et al., 2011; Filho et al., 2018; Oliveira et al., 2015), con regiones donde no se reporta la enfermedad (Rocha et al., 2009).

En Uruguay la enfermedad se diagnosticó por primera vez en la década de 1940 en tambos, tanto en vacas como en fetos abortados (Cassamagnachi & Cassamagnachi, 1943). Varias décadas después se observó una frecuencia de 6,5% (50/768) de establecimientos positivos al parásito en la cuenca lechera del país (Errico et al., 1978; Herrera et al., 1986).

La última referencia del parásito data del año 2005, cuando se reportó su observación por campo oscuro en el líquido abomasal de un feto bovino abortado, en coinfección con *Campylobacter fetus venerealis* (Easton, 2006), otro agente abortivo de transmisión venérea. En un estudio a nivel nacional en ganado de carne, se evaluaron por cultivo 1754 muestras de esmegma prepucial de toros, sin detección de animales positivos para *T. foetus* (Repiso et al., 2005).

Sin embargo, debido que no se han implementado masivamente programas de control y erradicación de tricomoniasis bovina en Uruguay, es esperable que la enfermedad continúe presente en los rodeos bovinos. El objetivo de este trabajo es comunicar la detección de *T. foetus* en toros destinados a la explotación de leche y carne en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Entre julio de 2016 y febrero de 2019, se obtuvieron 310 muestras de esmegma prepucial de toros de 56 establecimientos distintos, localizados en 12 departamentos de Uruguay (Tabla 1). Fueron muestreados 121 toros en sistemas productivos lecheros en 32 establecimientos y 189 toros de 29 predios de producción de carne, 5 establecimientos tenían toros de leche y carne (explotaciones mixtas). Los muestreos se realizaron de dos formas distintas: 1) directamente en establecimientos con problemas de abortos (146 toros de 15 establecimientos) y 2) en dos plantas de faena, de toros sin conocimiento de los datos reproductivos de los establecimientos. De los 15 establecimientos visitados, 13 eran tambos y 2 predios dedicados a la ganadería de carne, lo que correspondía a 98 y 48 toros muestreados, respectivamente (Tabla 2). El esmegma en estos toros se obtuvo por el método de raspaje prepucial (Tedesco et al., 1977) utilizando raspadores estériles descartables. El raspador se introdujo en el orificio prepucial, se alcanzó la mayor profundidad posible en la cavidad prepucial y se realizaron entre 20 y 30 movimientos en sentido anteroposterior. Posteriormente, el raspador se introdujo inmediatamente en tubos de 15 mL de capacidad que contenían 8 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sumergiendo toda la punta del raspador y transfiriendo la mayor cantidad posible del esmegma obtenido. Un mililitro de suspensión en PBS se transfirió inmediatamente a un medio de cultivo comercial para tricomonas (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Las muestras se enviaron a temperatura ambiente al laboratorio de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) para su procesamiento.

En los frigoríficos, se obtuvieron muestras de 23 toros originarios de 19 tambos y de 141 toros de carne provenientes de 27 predios distintos. Para obtener las muestras de esmegma prepucial, la parte externa del pene y el prepucio fueron recuperados postmortem y se raspó la mucosa prepucial con una espátula descartable (Terzolo et al., 1992). Las muestras se transfirieron a tubos con PBS estéril. La suspensión así obtenida se inoculó para cultivo como se describió arriba.

Cultivo de T. foetus

Para cultivo de *T. foetus* se utilizó el medio de cultivo Trichomonas (CM0161, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) adicionado con cloranfenicol 1% (100 µg/L; ION S.A., Montevideo, Uruguay) y suero bovino inactivado por calor en baño maría (8%; 56°C por 30min), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se incubaron a 37°C y alícuotas del cultivo se examinaron en microscopio óptico cada 24 horas durante 7 días (BonDurant, 2005). Para verificar cada lote de medio de cultivo se inocularon al menos 5 tubos con una cepa viable de *T. foetus* mantenida en el laboratorio, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

PCR para la detección de T. foetus

Para la extracción de ADN, 2 mL de la suspensión del esmegma en PBS se centrifugaron a 9500 g por 1 minuto. Luego, el sobrenadante se descartó y la extracción se realizó sobre el sedimento utilizando el kit comercial “Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección de *T. foetus* se amplificó el gen que codifica para el ARNr 5.8S y las regiones ITS1 e ITS2 utilizando los cebadores TRF-3 (5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3') y TRF-4 (5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3' (Felleisen et al., 1998). Para cada reacción se utilizaron 2,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,2 µl de dNTPs (10µM), 2,5 µl de albumina sérica bovina (BSA, 1%), 2,5 µl buffer (10x), 0,5 µl de cada cebador, 0,1 µl de ADN polimerasa Taq (5U; Invitrogen), 3 µl de ADN de la muestra y agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en un termociclador “Applied Biosystems ProFlex PCR System” (Thermo Fisher Scientific) utilizando un protocolo que incluyó una desnaturalización inicial (94°C, 3 min); 30 ciclos de: desnaturalización (94°C, 30 s), hibridación (65°C, 30 s) y extensión (72°C, 60 s); y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%,

teñido con Good View™ y se visualizaron en un fotodocumentador “Gel Doc™ EZ Imager” (Bio-Rad). El tamaño del fragmento esperado (347 pb), se determinó comparando con HyperLadder 100 pb (Bioline, UK).

Secuenciación de los amplicones

Para confirmar que los fragmentos amplificados correspondían a *T. foetus* se realizó la purificación y secuenciación en el servicio de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se ensamblaron y editaron utilizando el programa BioEdit (Versión 7.2.5; Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997).

Tabla 1: Cantidad de toros de leche y carne muestreados según el departamento de origen.

Departamento	Total de toros muestreados	
	Lechería	Ganadería de carne
Artigas	-	37
Canelones	3	38
Cerro Largo	2	18
Colonia	70	-
Flores	-	7
Florida	7	-
Paysandú	1	53
Salto	-	20
San José	20	5
Treinta y tres	-	11
Lavalleja	3	-
Soriano	15	-

RESULTADOS

Ninguna de las 310 muestras fue positiva por cultivo para *T. foetus*. La PCR reveló que el 2,25% (7/310) de los toros analizados fueron positivos para este agente. De los toros destinados a producción de leche, 5% (6/121) fueron positivos, todos ellos pertenecientes al mismo establecimiento de origen (establecimiento 9; Tabla 2). En los toros de carne, se detectó un animal positivo de 189 (0,5%).

El establecimiento lechero positivo está localizado en el departamento de Colonia, los 6 toros positivos eran de la raza Normando y tenían entre 1,5 y 3,5 años, los animales habían sido muestreados por visitas al predio. El toro de carne positivo, un Hereford de 6

años, era originario de un establecimiento del departamento de Treinta y Tres, y había sido muestreado en un frigorífico.

Del total de rodeos evaluados, 3,5% (2/56) tenían animales positivos para *T. foetus*, siendo un rodeo lechero y uno de ganado de carne. La frecuencia predial fue de 3,4% (1/29) en rodeos de carne y de 3,1% (1/32) en rodeos lecheros. Ninguno de los 5 establecimientos con explotación mixta fue positivo.

En la secuenciación genética, las muestras evaluadas tuvieron 100% de similitud con *T. foetus*.

Tabla 2: Identificación, departamento, tipo de explotación y cantidad de toros muestreados en los establecimientos visitados.

Id. Establecimiento	Departamento	Explotación	Cantidad de toros muestreados
1	Colonia	Lechería	4
2	San José	Lechería	2
3	Florida	Lechería	1
4	Canelones	Lechería	1
5	Florida	Lechería	1
6	San José	Lechería	7
7	Colonia	Lechería	14
8	Colonia	Lechería	1
9*	Colonia	Lechería	48
10	Colonia	Lechería	1
11	Lavalleja	Lechería	1
12	Lavalleja	Lechería	2
13	Soriano	Lechería	15
14	Paysandú	Ganadería	15
15	Paysandú	Ganadería	33

*Establecimiento con 6 toros positivos a *T. foetus* por PCR.

DISCUSIÓN

En este trabajo se detectó por PCR la presencia de ADN de *T. foetus* en toros de leche y de carne, aunque no se logró cultivar el agente. En Uruguay hacía más de una década que no se reportaba la circulación de *T. foetus* en bovinos. En este estudio los toros y los establecimientos fueron incluidos sin tener en cuenta su historia reproductiva.

Herrera et al., (1986) en la cuenca lechera del país, evaluaron muestras de esmegma prepucial, mucus vaginal y fetos y placentas de ganado abortado y determinaron una frecuencia de *T. foetus* a nivel predial de 6,5% (50/768). Sumando curiosamente, que entre

los años 1973 y 1985, solamente dos toros de carne evaluados fueron positivos a la infección por este parásito. Similar a lo reportado en dicho trabajo, aproximadamente 30 años después nuestros resultados sugieren que *T. foetus* está presente con mayor frecuencia en ganado lechero que de carne, aunque la proporción de predios con toros positivos fue similar en ambos sistemas productivos.

Los principales factores de riesgo para la tricomoniasis bovina son: la cantidad de toros en un mismo establecimiento, reproducción por servicio (monta) natural, y extenso periodo de servicio (servicio continuo) (Ondrak, 2016). En este trabajo todos los toros positivos destinados a lechería pertenecían al mismo establecimiento, donde había 48 toros en total, todos los cuales fueron incluidos en el muestreo. Rae et al., (2004) indican que los predios que tienen más de 10 toros por grupo de reproducción tienen 3,9 veces más oportunidades de tener infección por *T. foetus*. En Argentina, este último también es un factor de riesgo para la infección por *T. foetus*, sumado el manejo reproductivo continuo (Odds Ratio=1,59) (Molina et al., 2018a).

En Uruguay, 41,3% de los tambos usan servicio continuo como manejo reproductivo (Schild, 2017). Se reporta que 50% de los predios lecheros en el país usa únicamente servicio con toros (monta natural), y un 29% adicional utiliza la combinación de monta natural con IA, es decir que en el 79% de los tambos uruguayos la monta natural es el manejo de elección (INALE, 2014). El uso de toros para repaso como manejo reproductivo en gran parte de los establecimientos lecheros del país minimiza el uso de grandes grupos de estos animales. Por otro lado, la monta natural es un factor de riesgo que puede perpetuar el parásito y consecuentemente la enfermedad en los rodeos.

La detección de *T. foetus* por PCR ha sido previamente reportada (Felleisen et al., 1998; Gookin et al., 2002; Riley et al., 1995). Esta es una herramienta diagnóstica rápida independiente del cultivo que permite obtener resultados en pocas horas (Cobo et al., 2007; Mutto et al., 2006), mientras que el cultivo requiere de una semana para la obtención de resultados negativos (Cobo et al., 2007). La PCR convencional tiene una sensibilidad y especificidad de 78-98,38% y 93,75-96,7% respectivamente, más altas que las pruebas de cultivo (Cobo et al., 2007; Ho et al., 1994; Mukhufhi et al., 2003; Mutto et al., 2006).

Si bien los cebadores utilizados en este trabajo se reportan como específicos para *T. foetus*, Felleisen et al., (1998) reportaron que con estos mismos cebadores también amplificaron el ADN de *Tritrichomonas mobilensis* y *Tritrichomonas suis*. *T. mobilensis* es un parásito intestinal que ha sido identificado en monos ardilla (*Saimiri* spp.) (Culberson et al., 1986) y *T. suis* se encuentra en la cavidad nasal y el tracto digestivo de los cerdos (De

Carli & Guerrero Ramírez, 1975). Sin embargo, más recientemente la similitud morfológica, genética y de patogenicidad entre las cepas de *T. foetus* y *T. suis* están siendo ampliamente discutidas. Los autores indican que estas dos especies de *Tritrichomonas* son idénticas, proponiendo cambio en la nomenclatura de *T. suis*, ya que es sinónimo de *T. foetus* (Tachezy et al., 2002; Lun et al., 2005; Slapeta et al., 2012). Los factores arriba mencionados sugieren que la posibilidad de observación de *T. mobilensis* en muestras de esmegma prepucial bovino es baja y que la reacción cruzada con *T. suis* no influye en el diagnóstico ya que es una cepa equivalente a *T. foetus* en todos los aspectos. La secuenciación realizada desde las muestras positivas por PCR en ese estudio demostró 100% de similitud con *T. foetus*, lo que refuerza la confiabilidad de los resultados positivos.

La sensibilidad de la PCR convencional puede ser mejorada utilizando la qPCR para la detección de *T. foetus* (Dufernez et al., 2007; McMillen & Lew 2006), sin embargo, esta técnica no está ampliamente distribuida en los laboratorios veterinarios en Uruguay, entre otros motivos porque requiere técnicos altamente calificados para su ejecución y la validación e interpretación de los resultados, así como equipos y reactivos específicos costosos (Oyhenart, 2018).

En este estudio no fue posible aislar *T. foetus*. Este resultado puede deberse a diferentes factores que promueven una sensibilidad relativamente baja para el cultivo (Yao, 2013). Perez et al., (2006) reportaron una sensibilidad y especificidad de 72% y 95,4%, respectivamente, a partir un muestreo de 2838 toros usados para producción de carne. Debido al alto costo de un resultado falso negativo o positivo a *T. foetus*, es primordial utilizar pruebas que permitan identificar la mayor cantidad de verdaderos positivos y negativos. Con esta intención, y para lograr una comparación entre las dos pruebas más comúnmente usadas, utilizamos el cultivo y PCR de forma simultánea sobre las mismas muestras (Cobo et al., 2007), aumentando así la probabilidad de detección de animales positivos, incluso animales que podrían estar recientemente infectados.

El cultivo de *T. foetus* directamente de esmegma prepucial representa un desafío para los laboratorios diagnósticos ya que el medio de cultivo utilizado promueve el crecimiento de otros microorganismos. Esto afecta directamente el crecimiento de *T. foetus*, por la replicación más rápida de la microbiota acompañante y la acumulación de sus productos metabólicos que disminuyen el pH del medio (Clothier et al., 2015). A su vez, la contaminación de las muestras con materia fecal es otro inconveniente. En las heces puede haber protozoarios saprófitos no patogénicos, como *Tetratrichomonas* spp., *Pentatrichomonas hominis* y *Pseudotrichomonas* spp. que crecen en el medio de cultivo

utilizado y son similares en tamaño, forma y motilidad a *T. foetus* (Dufernez et al., 2007). Estas interferencias pueden conducir a un diagnóstico incorrecto de tricomoniasis bovina con importantes consecuencias debido a la eliminación de toros sanos o la perpetuación en el uso de reproductores falsos negativos.

CONCLUSIONES

Tritrichomonas foetus es un patógeno que sigue circulando en Uruguay, tanto en bovinos de leche como de carne. El cultivo del parásito es la prueba que más se ha utilizado para el diagnóstico de tricomoniasis en el país, aunque es posible que su empleo como única técnica resulte en sub-detección de la infección por *T. foetus*. La PCR convencional podría ser implementada en la rutina de los laboratorios de diagnóstico veterinario para la detección de este agente en muestras prepucales de toros vivos o faenados, aunque se requieren esfuerzos adicionales para la validación de la técnica en nuestras condiciones. Estudios epidemiológicos y de estimación de pérdidas económicas deberían realizarse para determinar la prevalencia y la real importancia de la tricomoniasis bovina para la ganadería uruguaya.

11. CONSIDERACIONES FINALES

Los 5 trabajos que forman esta tesis son resultados parciales de un proyecto (FSSA_X_2014_1_105696 titulado “*Causas y prevalencia de abortos y evaluación de índices reproductivos en rodeos bovinos lecheros con enfermedades abortivas en Uruguay*”) del fondo Sectorial de Salud Animal, financiado por ANII e INIA, en el que también se publicaron otros 4 trabajos correspondientes a la tesis doctoral de Melissa Macías-Rioseco. En su conjunto, los resultados representan un avance en el conocimiento de las enfermedades infecciosas abortivas que afectan el ganado lechero en Uruguay. Sin embargo, la investigación en enfermedades reproductivas en bovinos debe tener una continuidad buscando encontrar formas de disminuir las pérdidas económicas causadas por estas y otras enfermedades reproductivas. Las pérdidas gestacionales, las altas tasas de descarte y la mortalidad durante el período de cría en terneros limitan el crecimiento del rodeo lechero de Uruguay.

Los resultados de este proyecto sugieren que la neosporosis bovina es una importante causa de aborto en el rodeo lechero. Aunque no hay disponibles métodos de prevención y tratamiento de esta enfermedad aplicables masivamente a nivel de campo, se conocen diversos factores de riesgo asociados a la misma. El implemento de medidas de bioseguridad en los tambos, como el descarte adecuado de fetos y placentas y el control de la población canina, restringiendo el acceso al alimento y agua consumidos por las vacas y minimizando el contacto con las mismas, pueden disminuir la transmisión horizontal. El sacrificio selectivo de bovinos positivos (en predios con bajas prevalencias), la reposición con vaquillonas no infectadas, la permanencia de hijas de vacas seronegativas y el entore de vacas positivas con toros de carne son otras medidas que pueden ser aplicadas. Durante este proyecto se identificó además la necesidad de desarrollar una técnica de ELISA para detección de anticuerpos contra *N. caninum*, que sea accesible económicamente para los productores y veterinarios que deseen controlar la neosporosis. Esta inquietud ha sido transferida a otros grupos de investigación que cuentan con las herramientas para el desarrollo y validación de estas técnicas en el país.

El estudio de leptospirosis ha tomado impulso en estos últimos años en el país. Además de los resultados obtenidos dentro del proyecto mencionado arriba, se ha creado recientemente un banco de cepas de *Leptospira* spp. aisladas de bovinos de Uruguay (Zarantonelli et al., 2018). Se estima que aproximadamente 20% de las vacas eliminan

Leptospiras patógenas por la orina. A pesar de esto, la epidemiología de la leptospirosis en Uruguay merece ser mejor estudiada en futuros proyectos, para investigar el rol de estas *Leptospira* spp. como causa de alteraciones reproductivas, estudiar la ocurrencia de brotes de abortos por leptospirosis, que no fueron constatados en este proyecto, desarrollar vacunas con los serogrupos circulantes en el país y comprobar que las mismas sean seguras y eficaces.

La campilobacteriosis por *Campylobacter fetus venerealis* no fue diagnosticada en los tambos estudiados en esta tesis. Sin embargo, considerando que fue una enfermedad diagnosticada desde la década de 1970 en rodeos bovinos de Uruguay, sin que en este período se haya instrumentado una campaña de control adecuada, y que hay reportes recientes de abortos bovinos por este agente (Macías-Rioseco, 2019), es evidente que la enfermedad continúa ocurriendo en la cuenca lechera. Esto tiene importancia dado que 50% de los tambos siguen utilizando únicamente toros para el manejo reproductivo y 20% o más utilizan repaso con toros luego de la inseminación artificial (INALE, 2014). Además, solamente 26,8% de los rodeos lecheros reciben vacunación contra esa enfermedad (Federico Fernández, MGAP, comunicación personal, 2018). Seguir desarrollando métodos de diagnóstico accesibles para los laboratorios veterinarios en diversas regiones del país y estudiar la eficiencia de las vacunas utilizadas en Uruguay es importante para establecer la prevalencia, la importancia económica y las formas de control de esta enfermedad.

Una situación similar a la de la campilobacteriosis ocurre con la tricomonosis, que después de no ser diagnosticada durante muchos años, fue detectada por nuestro grupo recientemente en ganado de leche y ganado de carne. En este caso el PCR desarrollado por este proyecto es una herramienta que podrá ser utilizada por los laboratorios para diagnóstico, para estudios adicionales de epidemiología y control.

Durante este estudio fueron identificados casos de infección por virus de la diarrea viral bovina causando diferentes cuadros clínicos. Considerando que esta enfermedad, que causa diferentes presentaciones clínicas, es responsable por numerosas pérdidas económicas en diversos países, es evidente la necesidad de continuar los trabajos para determinar la epidemiología, importancia económica y formas de control de esta enfermedad en Uruguay.

Un importante avance registrado durante el desarrollo de este proyecto es la puesta a punto y estandarización de técnicas de diagnóstico que permitirán, no solo el diagnóstico, sino también la continuidad de trabajos de investigación para resolver problemas relacionados a la epidemiología, importancia económica y formas de control de las enfermedades reproductivas de los bovinos en Uruguay.

12. REFERENCIAS

- 1- Abril C, Vilei E, M., Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R. (2007). Discovery of insertion element *ISCfe1*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(10): 993-1000.
- 2- Akhtar S, Riemann HP, Thurmond MC, Franti CE. (1993). The association between antibody titres against *Campylobacter fetus* and reproductive efficiency in dairy cattle. *Veterinary Reserch Communication*. 17(3): 183-191.
- 3- Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM. (2003). Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*. 34:341–352.
- 4- Alvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology*. 198(1-2):85–95.
- 5- Alves TM, Stynen APR, Miranda KL, Lage AP. (2011). Bovine genital campylobacteriosis and bovine genital trichomonosis: epidemiology, diagnosis and control. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 31: 336-344.
- 6- Altschul S, Madden T, Schäfer A, Zhang J, Miller W, Lipman D. (1997). Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17):3389–3402.
- 7- Anderson, ML. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. *Theriogenology*. 68(3): 474-486. Arduino GDGC, Girio RJS, Magajevski FS, Pereira GT. (2009). Agglutinating antibody titers induced by commercial vaccines against bovine leptospirosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(7):575-582.
- 8- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Hoffman RL. (1990). A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2(4): 283-287.
- 9- Antoniassi NAB, Juffo GD, Santos ASD, Pescador CA, Corbellini LG, Driemeier D. (2013). Causes of bovine abortion diagnosed by the Sector de Veterinary Pathology of the Federal University of Rio Grande do Sul in the years 2003-2011. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(2): 155-160.
- 10- Baker JC. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 11(3):425–445.
- 11- Balamurugan V, Alamuri A, Bharathkumar K, Patil SS, Govindaraj GN, Nagalingam M, Krishnamoorthy P, Rahman H, Shome BR. (2018). Prevalence of *Leptospira* serogroup-specific antibodies in cattle associated with reproductive problems in endemic states of India. *Tropical animal health and Production*. 50(5):1131-1138.
- 12- Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. (2006). A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. 139(1-3): 15–20.
- 13- Barcellos M. (2018). Diagnóstico y caracterización genética de *Campylobacter* en materia fecal de animales domésticos y silvestres de la región. [Tesina de grado]. [Montevideo]. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- 14- Bartels CJM, Wouda W, Schukken YH. (1999). Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*. 52(2): 247–257.
- 15- Bauermann FV, Flores EF, Ridpath JF. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24(2): 253–261.

- 16- Bianchi MV, Konradt G, de Souza SO, Bassuino DM, Silveira S, Mosena AC, Canal CW, Pavarini SP, Driemeier D. (2017). Natural outbreak of BVDV-1-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Veterinary Pathology*. 54: 242–248.
- 17- Bielefeldt-Ohmann H, Tolnay AEE, Reisenhauer CE, Hansen TR, Smirnova N, Van Campen H. (2008) Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathy. *Journal Comparative Pathology*. 138: 72–85.
- 18- Björkman, C, Alenius S, Manuelsson U, Uggla A. (2000) *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Veterinary Journal*. 159: 201–206.
- 19- Boehringer Ingelheim (2018) Boehringer Ingelheim Saúde Animal lança Bovela™, nova aliada no combate à Diarreia Viral Bovina (BVD). <https://www.boehringer-ingelheim.com.br/press-release/boehringer-ingelheim-saude-animal-lan%C3%A7a-bovela-nova-aliada-no-combate-a-diarreia-viral-bovina-bvd>
- 20- Bolin SR, McClurkin AW, Coria MF. (1985). Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *American Journal of Veterinary Research*. 46(11): 2385-2387.
- 21- BonDurant RH. (2005). Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 21(2): 383-408.
- 22- BonDurant RH. (2007). Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*. 68(3): 461-473.
- 23- Bove R, López F, Perera C, Carracelas B, Torres-Dini D, De Souza G, Azambuja 6 C, Bermúdez J, Alzugaray F, Mederos A. (2013). Diagnosis of *Campylobacter fetus venerealis* in aborted bovine fetus. *Veterinaria (Montevideo)* 49: 20-28.
- 24- Breslow NE. Case-Control Studies. En: Ahrens W. & Pigeot I. *Handbook of Epidemiology*, 2ª edición. New York, USA, SPRINGER, 2014, p. 293–323.
- 25- Briano C, Romero A, Sica AB, Federici MT, Rizza MD, Llambí S, Giannitti F, Caffarena RD, Schild CO, Casaux ML, Quintela FD. (2019). Mutaciones letales y semiletales en terneros Holando de Uruguay. *Anales de las XLVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay*, pp. 114-117.
- 26- Brodersen BW. (2014). Bovine viral diarrhoea virus infections: Manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*. 51(2): 453–464.
- 27- Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G. (2004). Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Veterinary Microbiology*. 103: 77-84.
- 28- Cabrera A, Berná L, Fresia P, Silveira CS, Macías-Rioseco M, Pritsch O, Riet-Correa F, Giannitti F, Francia ME, Robello C. (2018). Aislamiento y caracterización genética de cuatro nuevas cepas de *Neospora caninum* en Uruguay. *Primer Encuentro Bienal de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay*.
- 29- Calandra PM, Di Matía JM, Cano DB, Odriozola ER, García JA, Späth EJ, Odeón AC, Paolicchi FA, Morrell EL, Campero CM, Moore DP. (2014). Endemic and epidemic bovine neosporosis: description of two events in beef cattle. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(4):315–319.
- 30- Campero CM. (2000). Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. 53: 88–112.
- 31- Campero CM, Anderson ML, Walker RL, Blanchard PC, Barbano L, Chiu P, Martínez A, Combessies G, Bardon JC, Cordeviola J. (2005). Immunohistochemical identification of

- Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. Journal of Veterinary Medicine. 52: 138-141.
- 32- Campero CM, Cantón GJ, Moore DP. (2017). Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos: diagnóstico y control. Ciudad autónoma de Buenos Aires: Ed. Hemisferio sur. 384p.
 - 33- Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore DP, Hecker Y, Campero CM, Schares G, Venturini MC. (2015). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 47:295–301.
 - 34- Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. Veterinary Research Communications. 27(5): 359-369.
 - 35- Campero LM, Moreno-Gonzalo J, Venturini MC, Moré G, Dellarupe A, Rambeaud M, Echaide IE, Valentini B, Campero CM, Moore DP, Cano DB, Fort M, Mota RA, Serrano-Martínez ME, Cruz-Vázquez CC, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. (2018). An Iber-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. Tropical Animal Health Production. 50:75–84.
 - 36- Cantón G, Fiorentino A, Moreira A, Hecker Y, Verna A, Moore P, Paolicchi F, Lischinsky L, Licoff N, Odeón A, Odriozola E, Morrell E, Brihuega B. (2006). Pérdidas reproductivas en bovinos de Argentina asociados a seropositividad a *Leptospira interrogans* sejourne wolffi y hardjo. XXI AAVLD, San Salvador de Jujuy. Argentina.
 - 37- Cassamagnaghi A, Cassamagnaghi A. (1944). La trichomoniasis de los bovinos. Su reconocimiento en el ganado uruguayo. Anales de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, pp.357-375.
 - 38- Catena M, Callejas SS, Soto P, Aba MA, Echeverría HE, Monteavaro C, Mazzolli, A. (2003). Effects of experimental infection with *Campylobacter fetus venerealis* on early pregnancy in heifers. Revista de Medicina Veterinaria. 5: 37-44.
 - 39- Chaban B, Garcia Guerra A, Hendrick SH, Waldner CL, Hill JE. (2013). Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. American Journal of Veterinary Research. 74(8):1066-1069.
 - 40- Chang WJ, Ogg JE. (1971). Transduction and mutation to glycine tolerance in vibrio fetus. American Journal of Veterinary Research. 32(4): 649.
 - 41- Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type 1 interferon. The Journal of General Virology. 82(Pt 8): 1893–1897.
 - 42- Cicchetti DV, Feinstein AR. (1990). High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. Journal Clinical Epidemiology. 43:551–558.
 - 43- Cipolla A, Cordeviola J, Terzolo H, Combessies G, Bardón J, Ramón N, Martínez A, Medina D, Morsella C, Malena R. (2001). *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. Altex. 18(3): 165-170.
 - 44- Clark BL. (1971). Review of bovine vibriosis. Australian Veterinary Journal. 47: 103-107.
 - 45- Clark CG, Diamond LS. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical microbiology reviews, 15(3), 329-341.
 - 46- Clothier K, Anderson M. (2016). Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. Theriogenology 15:933-938.

- 47- Clothier KA, Villanueva M, Torain A, Hult C, Wallace R. (2015). Effects of bacterial contamination of media on the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* by culture and real-time PCR. *Veterinary Parasitology*. 208:143-149.
- 48- Cobo ER, Favetto PH, Lane VM, Friend A, VanHooser K, Mitchell J, BonDurant RH. (2007). Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* 68(6):853–860.
- 49- Corbellini LG, Pescador CA, Frantz F, Wunder E, Steffen D, Smith DR, Driemeier D. (2006) Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *The Veterinary Journal*. 172(1): 114-120.
- 50- Culbertson DE, Pindak FF, Gardner WA, Honigberg BM. (1986). *Tritrichomonas mobilensis* n. sp. (Zoomastigophorea: Trichomonadida) from the Bolivian squirrel monkey *Saimiri boliviensis boliviensis*. *Journal of Protozoology*. 33:301–304.
- 51- Dápice M. (1956). Ocorrência de aborto bovino no Estado de São Paulo. *Biológico*. 22: 15-18.
- 52- De Carli G, Guerrero Ramirez J. (1975). *Tritrichomonas suis*: isolamento, morfologia e incidência na cavidade nasal de porcos domésticos do Rio Grande do Sul. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*. 12(1):269–276.
- 53- Deng M, Ji S, Fei W, Raza S, He C, Chen Y, Chen H, Guo A. (2015). Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS ONE* 10: e0121718.
- 54- Devenish J, Brooks B, Perry K, Milnes D, Burke T, McCabe D, et al. (2005). Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(11): 1261-1268.
- 55- De Vries A. (2006). Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal Dairy Science*. 89(10): 3876-3885.
- 56- Delpiazzo R, Calleros L, Barcellos M, Paolichi F, Morsella C, Silveira CS, Fraga M, Riet-Correa F, Gil J. (2019). Identificación de *Campylobacter fetus* por cultivo y real time PCR en muestras prepuciales de toros. *Anales de las XLVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay*, pp. 167-170.
- 57- Des Côtéaux L, Gnemmi G, Colloton J. (2010). Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography. Blackwell Publishing, pp. 1–244.
- 58- Dias RK, Cargnelutti JF, Weber MN, Canal CW, Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF. (2017). Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Veterinary Microbiology*. 203: 221–228.
- 59- DIEA. Anuario Estadístico Agropecuario – MGAP (2018). Disponible online en: https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf
- 60- Dijkstra T, Barkema HW, Hesselink JW, Wouda W. (2002). Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Veterinary Parasitology*. 105(2): 89–98.
- 61- Draghi MG, Brihuega B, Benitez D, Sala JM, Biotti G M, Pereyra M, Homse A, Guariniello L. (2011). Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 43(1), 42-44.
- 62- Dubey JP, Schares G. (2011). Neosporosis in animals-The last five years. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2):90–108.
- 63- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(2):323–367.
- 64- Dufernez F, Walker RL, Noël C, Caby S, Mantini C, Delgado-Viscogliosi P, Ohkuma M, Kudo T, Capron M, PIERCE RJ, Villanueva MR, Viscogliosi E. (2007). Morphological and

- molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 54(2):161-168.
- 65- Eaglesome MD, Garcia MM. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. Veterinary Bulletin. 62: 743-775.
- 66- Easton C. (2006) Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. [Tesis de Maestría]. [Montevideo]: Facultad de Veterinaria, UDELAR. Uruguay.
- 67- Ellis WA. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice. 10(3): 463-478.
- 68- Ellis WA. (2015). Animal leptospirosis. En: *Leptospira* and leptospirosis. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 99-137.
- 69- Errico F, Bosman M, Tedesco L, Bermúdez J, Barriola J. (1978). Enfermedades venéreas de los bovinos (vibriosis genital y tricomoniasis bovina). Presencia y distribución en el país. Anales de las Sextas Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp. 1-4.
- 70- Fávero JF, Da Silva AS, Campigotto G, Machado G, de Barros LD, Garcia JL, Vogel FF, Mendes RE, Stefani LM. (2017). Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. Microbial Pathogenesis. 110: 202-207.
- 71- Favero M, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. (2001). Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. Arquivo do Instituto Biológico. 68(2): 29-35.
- 72- Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein, B. (1998). Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. Journal of Clinical Microbiology. 36(2), 513-519.
- 73- Fernandez ME, Campero CM, Morrell E, Cantón GJ, Moore DP, Cano A, Malena R, Odeón AC, Paolicchi F, Odriozola ER. (2007). Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. Revista de Medicina Veterinaria. 88: 246-254.
- 74- Figueiredo JF, Pellegrin AO, Fóscolo CB, Machado RP, Miranda KL, Lage AP. (2002). Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. Revista Latinoamericana de Microbiología. 44(3-4): 118-123.
- 75- Filho RBO, Malta KC, Borges JM, Oliveira PRF, Filho GJS, Nascimento GG, Mota RA, Júnior JWP. (2018). Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. Acta Parasitologica. 63(2):346-353.
- 76- Filho RBO, Malta KC, Lúcio EC, Nascimento GG, Dutra LC, Mota, RA, Pinheiro JW Jr. (2018). Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in dairy cows from Brejo Paraibano, Brazil. Acta Scientiae Veterinariae. 46(1): 7.
- 77- Fitzgerald C, Tu ZC, Patrick M, Stiles T, Lawson AJ, Santovenia M, Gilbert ML, Van Bergen M, Joyce K, Pruckler J., Stroika S, Duim B, Miller WG, Loparev V, Sinnige JC, Fields PI, Tauxe RV, Blaser MJ, Wagenaar JA. (2014). *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64(9): 2944–2948.
- 78- Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH. (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. Virus Research. 87(1): 51–60.
- 79- Flores EF, Schuch LFD. (2007). Diarrea viral bovina. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. p. 81-93.

- 80- Frössling J, Bonnett B, Lindberg A, Björkman C. (2003). Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. Preventive Veterinary Medicine. 57:141–53.
- 81- Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. (1998). Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. The Journal of Parasitology. 84(4):753-58.
- 82- Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman, RG, Bolin SR, Ridpath JF, Payton ME. (2000) Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 12(1): 33–38.
- 83- Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. (2005) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. Veterinary Microbiology. 111: 35–40.
- 84- Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ. (2000). Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. Canadian Journal of Veterinary Research. 64(3): 151–159
- 85- Furtado A, Rosadilla D, Cattáneo M, Bermúdez J, Puentes R. (2011). Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em pequenas propriedades leiteiras do Uruguai. Ciencia Rural. 41(4): 673–675.
- 86- Gädicke P, Montib G. (2008). Aspectos epidemiológicos y de análisis del síndrome de aborto bovino. Archivos de Medicina Veterinaria. 40(3): 223–234.
- 87- Gaede W, Reiting R, Schirrmeyer H, Depner KR, Beer M. (2005) Detection and species-specific differentiation of pestiviruses using real-time RT-PCR. Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift. 118(3-4): 113–120.
- 88- Garcia, EFS. (2009). Análisis comparativo entre inseminación artificial a tiempo fijo e inseminación artificial a celo detectado, con sus variables económicas y reproductivas. [Professional practice report]. [Caldas]: Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. Colombia.
- 89- Genovez ME. (1997). Campilobacteriose genital bovina. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 21: 48-52.
- 90- Ghalmi F, China B, Kaidi R, Losson B. (2009). Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 21:108–111.
- 91- Givens MD, Marley MSD. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology. 70(3):270-285.
- 92- Goodger WJ, Skirrow SZ. (1986). Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. Journal of American Veterinary Medical Association. 189(7):772-776.
- 93- Gookin JL, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB, Levy MG. (2002). Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. Journal of Clinical Microbiology. 40(11):4126-4130.
- 94- Gondim LFP, McAllister MM, Gao L. (2005). Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. Veterinary Parasitology 134(1-2): 33-39.
- 95- González Altamiranda EA, Kaiser GG, Weber N, Leunda MR, Pecora A, Malacari DA, Morán O, Campero CM, Odeón AC. (2012). Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. Animal Reproduction Science. 133(3-4): 146–152.
- 96- Gordis L. (2015). Estudios de casos y controles y otros diseños de estudio. En: Gordis L. Epidemiología, 5º edición. Barcelona, ES, ELSEVIER, p.189–214

- 97- Grassmann AA, Souza JD, McBride AJA. (2017). A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction? *Frontiers in immunology*. 8:256.
- 98- Griffiths IB, Gallego MI, De Leon LS. (1984). Levels of some reproductive diseases in the dairy cattle of Colombia. *Tropical Animal Health Production*. 16: 219-223.
- 99- Grimard B, Freret S, Chevallier A, Pinto A, Ponsart C, Humblot P. (2006). Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Animal reproduction science*. 91(1-2): 31-44.
- 100- Groff A, Kirinus JK, Machado G, Costa MM, Vargas AP. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 30: 1031-1035.
- 101- Grooms DL. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics North America. Food Animal Practice*. 20(1):5-19.
- 102- Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*. 85(1-2): 34-40.
- 103- Guerra AG, Chaban B, Hill JE, Waldner CL, Hendrick SH. (2014). Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in preputial samples from bulls. *American Journal Veterinary Research*. 75(9): 851-860.
- 104- Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. (2016). Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends in Parasitology*. 32(2):131-43.
- 105- Harwood LJ, Thomann A, Brodard I, Makaya PV, Perreten V. (2009). *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* transport medium for enrichment and PCR. *The Veterinary Record*. 165(17): 507-508.
- 106- Herrera B, Repiso MV, Silveyra S. (1986). Algunos aspectos de la trichomoniasis y campylobacteriosis bovina, en la cuenca lechera del Uruguay. *Anales de la XIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay*, pp. 1-7.
- 107- Ho MSY, Conrad PA, Conrad PJ, LeFebvre RB, Perez E, BonDurant RH. (1994). Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(1):98-104.
- 108- Hoffer MA. (1981). Bovine campylobacteriosis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*. 22(11): 327-330.
- 109- Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *Journal of Virological Methods* 136: 200-209.
- 110- Houe H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137-143.
- 111- Hum S, Quinn C, Kennedy D. (1994). Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Australian Veterinary Journal*. 71: 140-143.
- 112- Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*. 75(11): 827-831.
- 113- Hum S, Stephens LR, Quinn C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Australian Veterinary Journal*. 68(8): 272-275.
- 114- Humblot P. (2001). Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*. 56(9):1417-1433.
- 115- IBGE. Censo agropecuário (2017). Available from: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/producao.pdf
- 116- ICTV, International Committee for the Taxonomy of Viruses. Master Species List 2018a, v1, available at: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/7992>

- 117- INALE. (2014). Instituto Nacional de la Leche “Encuesta Lechera”. Disponible online en: <https://www.inale.org/historico/wp-content/uploads/2018/08/Encuesta-lechera-2014.pdf>
- 118- Iraola G, Forster SC, Kumar N, Lehours P, Bekal S, García-Peña FJ, Paolicchi F, Morsella C, Hotzel H, Hsueh PR, Vidal A, Lévesque S, Yamazaki W, Balzan C, Vargas A, Piccirillo A, Chaban B, Hill JE, Betancor L, Collado L, Truysers I, Midwinter AC, Dagi HT, Mégraud F, Calleros L, Pérez R, Naya H, Lawley TD. (2017). Distinct *Campylobacter fetus* lineages adapted as livestock pathogens and human pathobionts in the intestinal microbiota. *Nature Communication*. 8(1): 1367.
- 119- Iraola G, Hernández M, Calleros L, Paolicchi F, Silveyra S, Velilla A, Pérez R. (2012). Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of Veterinary Science*. 13(4): 371-376.
- 120- Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Piccirillo A, Tomás G, Vililla A, Calleros L. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research*. 12: 286.
- 121- Iraola G, Pérez R, Naya H, Paolicchi F, Harris D, Lawley TD, Rego N, Hernández M, Calleros L, Carretto L, Velilla A, Morsella C, Méndez A, Gioffre A. (2013). Complete genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*, isolated from the prepuce of a bull. *Genome Announcements*. 1(4): e00526-13.
- 122- Jesus VLT, Três JE, Jacob JCF, Latorre LBLM, Júnior JCBS. (1999). Campilobacteriose genital bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 6:
- 123- Jimenez DF, Perez AM, Carpenter TE, Martinez A. (2011). Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*. 101(3-4): 157-162.
- 124- Junqueira JRC, de Freitas JC, Alfieri AF, Alfieri AA. (2006). Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. *Semina: Ciências Agrárias*, 27(3).
- 125- Kalaycioglu AT, Russell PH, Howard CR. (2012). The characterization of the neutralizing bovine viral diarrhoea virus monoclonal antibodies and antigenic diversity of E2 glycoprotein. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74: 1117–1120.
- 126- Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. 120(1-2):139–144.
- 127- Kelling CL, Topliff CL. (2013). Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. *Biologicals* 41: 20–25.
- 128- Khodakaram-Tafti A, Ikede BO. (2005). A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *Canadian Veterinary Journal*. 46(7): 635.
- 129- Kim SG, Dubovi EJ. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*. 31:103–106.
- 130- Kim JH, Lee JK, Lee BC, PARK BK, Yoo HS, Hwang WS, Shin NR, Kang MS, Jean YH, Yoon HJ, Kang SK, Kim DY. (2002). Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64(12), 1123-1127.
- 131- Koya A, de Wet SC, Turner S, Cawdell-Smith J, Venus B, Greer RM, Lew-Tabor AE, Boe-Hansen GB. (2015). Evaluation and histological examination of a *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* small animal infection model. *Research in Veterinary Science*. 99: 1-9.

- 132- Lage AP, Leite RC. (2000). Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Pecuária de Corte*. 100: 50-54.
- 133- Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*. 199: 201–209.
- 134- Linton D, Owen RJ, Stanley J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in microbiology*. 147(9), 707-718.
- 135- Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C. (2009). Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Veterinary Microbiology*. 138:62–68.
- 136- Lopez-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S. (2004). *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 51(7):348–52.
- 137- Lun ZR, Chen XG, Zhu XQ, Li XR, Xie MQ. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in Parasitology*. 21(3):122-125.
- 138- Lunardi M, Headley SA, Lisbôa JA, Amude AM, Alfieri AA. (2008). Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Research in Veterinari Science*. 85(3): 599–604.
- 139- Luzzago C, Frigerio M, Piccinini R, Daprà V, Zecconi A. (2008). A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. *The Veterinary Journal*. 177(2): 236–241.
- 140- Macchi, MV. (2019). Estudio Epidemiológico de la neosporosis bovina del rodeo lechero en el Uruguay. [Tesis de maestría]. [Montevideo]. Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.
- 141- Macedo CAB, Macedo MFSB, Miura AC, Taroda A, Cardim ST, Innes EA, Katzer F, Cantón GJ, Chianini F, Headley SA, Garcia JL. (2017). Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 26(3):292–8.
- 142- Macías-Rioseco M. (2019). Causas de aborto em bovinos lecheros de Uruguay. [Tesis de Doctorado]. [Montevideo]: Facultad de Veterinaria, UDELAR. Uruguay.
- 143- Macías-Rioseco M, da Silva Silveira C, Cabrera A, Mirazo S, Fraga M, Uzal F, Giannitti F, Riet-Correa F. (2018). Diagnóstico de aborto em bovinos leiteiros no Uruguai. X Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (ENDIVET), Recife, Pernambuco, Brasil.
- 144- Martins G, Oliveira CS, Lilenbaum W. (2018). Dynamics of humoral response in naturally-infected cattle after vaccination against leptospirosis. *Acta Tropica*. 187:87-91.
- 145- Marcellino RB, Morsella CG, Cano D, Paolicchi FA. (2015). Efficiency of bacteriological culture and the immunofluorescent assay to detect *Campylobacter fetus* in bovine genital fluids. *Revista Argentina de Microbiologia*. 47: 183-189.
- 146- Maya L, Puentes R, Reolón E, Acuña P, Riet F, Rivero R, Cristina J, Colina R. (2016). Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. *Archives of Virology*. 161: 529–535.
- 147- McAllister MM, Bjorkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers D. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 217(6):881–887.
- 148- McFadden AM, Heuer C, Jackson R, West DM, Parkinson TJ. (2005). Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. *New Zeland Veterinary Journal*. 53: 45-52.
- 149- McHugh ML. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)*. 22(3):276–82.

- 150- McMillen L, Fordyce G, Doogan VJ, Lew AE. (2006). Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3): 938-945.
- 151- McMillen L, Lew AE. (2006). Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Veterinary Parasitology*. 141:204–215.
- 152- Miranda, KL. (2005). Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros de corte em alguns estados brasileiros em 2000. [dissertation/master's thesis]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Brasil.
- 153- Moennig V, Liess B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 11: 477–487.
- 154- Monke HJ, Love BC, Wittum TE, Monke DR, Byrum BA. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 14(1): 35-39.
- 155- Molina LL, Angón E, García A, Caballero-Villalobos J, Giorgis AO, Moralejo RH, Perea J. (2018a). A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*. 161:109-114
- 156- Molina LL, Angón E, García A, Moralejo RH, Caballero-Villalobos J, Perea J. (2018b). Time series analysis of bovine venereal diseases in La Pampa, Argentina. *PLoS ONE*. 13: 1-17.
- 157- Molina L, Perea J, Meglia G, Angón E, García, A. (2013). Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*. 110: 388-394.
- 158- Moore DP. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology*. 127(2):87–97.
- 159- Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. (2013). *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Tropical Animal Health Production*. 45(5):1237–1241.
- 160- Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Morrell E, Poso MA, Cano DB, Leunda MR, Linschinky L, Odeón AC, Odriozola E, Ortega-Mora LM, Campero CM. (2008). The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 156(3-4):163–7.
- 161- Morrell E. (2010). Caracterización diagnóstica de las causas infecciosas del aborto bovino. [Tesis de Doctorado]. [La Plata]. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- 162- Morrell EL, Barbeito CG, Odeon CA, Gimeno EJ, Campero CM. (2011). Histopathological, immunohistochemical, lectin histochemical and molecular findings in spontaneous bovine abortions by *Campylobacter fetus*. *Reproduction in Domestic Animals*. 46: 309-315.
- 163- Mósená AC, Weber MN, Cibulski SP, Silveira S, Silva MS, Mayer FQ, Canal CW. (2017). Genomic characterization of a bovine viral diarrhoea virus subtype 1i in Brazil. *Archivos de Virologia*. 1624: 1119–1123.
- 164- Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu GO. (2010). Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 221-230.
- 165- Mukhufhi M, Irons PC, Michel A, Peta F. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology* 60(7):1269–1278.

- 166- Mutto AA, Giambiaggi S, Angel SO. (2006). PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. *Veterinary Parasitology*. 136(3-4):357-361.
- 167- Newcomer BW, Chamorro MF, Walz PH. (2017). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*. 206: 78–83.
- 168- Nogared C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezo M, Gonzales-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almeria S. (2007). Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Veterinary Parasitology*. 148(3-4):193–199.
- 169- Odeón AC, Leunda MR, Faverín C, Boynak N, Vena MM, Zabal O. (2009). In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Revista Argentina de Microbiología*. 41(2): 79–85.
- 170- Odeón AC, Risatti G, Kaiser GG, Leunda MR, Odriozola E, Campero CM, Donis RO. (2003). Bovine viral diarrhea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 17: 133–144.
- 171- OIE. Bovine genital campylobacteriosis (Chap. 2.4.4) (2017). Disponible online en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.04_BGC.pdf
- 172- Old-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO, Touratier A, Sanaa M, Mialot JP. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research*. 30(5): 531–538.
- 173- Oliveira JMB, da Silva GM, Batista Filho AFB, de Melo Borges J, de Oliveira PRF, Brandespim DF, Mota RA, Pinheiro JW Jr. (2015). Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Tropical Animal Health Production*. 47(3): 549-555.
- 174- On SL, Harrington CS. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal of Applied Microbiology*. 90(2): 285-293.
- 175- Ondrak JD. (2016). *Tritrichomonas foetus* prevention and control in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 32: 411-423.
- 176- Otaka DY, Martins G, Hamond C, Penna B, Medeiros MA, Lilenbaum W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Veterinary Record*; 170(13):338-338.
- 177- Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, di Regalbono AF, Badan M, Capelli G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology*. 118(1-2): 7–18.
- 178- Oyhenart J. (2018). Direct detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle genital fluid through loop mediated isothermal amplification of elongation factor 1 alpha 1. *Veterinary Parasitology*. 261:67-72.
- 179- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213(11), 1595–1598.
- 180- Pecora A, Malacari DA, Pérez Aguirreburualde MS, Bellido D, Escribano JM, Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. (2015). Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. *Revista Argentina de Microbiología*. 47: 4–8.
- 181- Pecora A, Malacari DA, Ridpath JF, Pérez Aguirreburualde MS, Combessies G, Odeón AC, Romera SA, Golemba MD, Wigdorovitz A. (2014) First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*. 96: 204–212.
- 182- Pecora A, Pérez Aguirreburualde MS, Malacari DA, Zabal O, Sala JM, Konrad JL, Caspe SG, Bauermann F, Ridpath J, Dus Santos MJ. (2017). Serologic evidence of HoBi-like virus

- circulation in Argentinean water buffalo. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(6): 926–929.
- 183- Pecoraro HL, Thompson B, Duhamel GE. (2017) Histopathology case definition of naturally acquired *Salmonella enterica* serovar Dublin infection in young Holstein cattle in the northeastern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(6): 860–864.
- 184- Pellegrin AO, Lage AP, Sereno JRB, Ravaglia E, Costa MS, Leite RC. (2002). Bovine genital campylobacteriosis in Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux* 55: 169-173.
- 185- Perez A, Cobo E, Martínez A, Campero C, Späth E. (2006). Bayesian estimation of *Tritrichomonas foetus* diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. *Veterinary Parasitology*. 142(1-2):159–162.
- 186- Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107–112.
- 187- Piaggio J, Núñez A, Sienna R, Gil A. (2004). Cross-sectional study of *Neospora caninum* in Uruguayan dairy cattle. XXIII World Buiatrics Congress, p.40, Québec, Canada.
- 188- Picardeau M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. *Nature Reviews Microbiology*. 15(5), 297.
- 189- Pizarro-Lucero J, Celedón MO, Aguilera M, de Calisto A. (2006). Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*. 115: 208–217.
- 190- Plank R, Dean D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and infection*. 2(10):1265-1276.
- 191- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253-1256.
- 192- Quinn HE, Windsor PA, Kirkland PD, Ellis TJ. (2004). An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Australian Veterinary Journal*. 82: 99–101.
- 193- Rae DO, Crews JE. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 22: 595-611.
- 194- Rae DO, Crews JE, Greiner EC, Donovan GA. (2004). Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology* 61:605-618.
- 195- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *International Journal for Parasitology*. 43(2):133–42.
- 196- Reichel MP, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. (2014). Control options for *Neospora caninum* – is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*. 141(11): 1455–1470.
- 197- Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal*. 220: 80–87.
- 198- Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 40: 5-28.
- 199- Ribeiro CM, Falleiros MB, Bicudo SD, Júnior JA, Golim MA, Silva Filho FC, Padovani CR, Modolo JR. (2010). *Tritrichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology*. 73:64-70.

- 200- Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD. (2010). Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22(2): 184–191.
- 201- Riley DE, Wagner B, Polley L, Krieger JN. (1995). PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1308–1313.
- 202- Rocha FSD, Jesus VLTD, Torres HM, Gomes MJ, Figueiredo MA, Nascimento ERD, Ferreira T, Aquino MHC. (2009). *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus* investigation in prepuccial mucous of bulls from Médio Paraíba/RJ region, Brazil. *Ciencia Rural*. 39(5): 1586-1589.
- 203- Roelandt S, Van der Stede Y, Czaplicki G, Van Loo H, Van Driessche E, Dewulf J, Hooyberghs J, Faes C. (2015). Serological diagnosis of bovine neosporosis: A Bayesian evaluation of two antibody ELISA tests for in vivo diagnosis in purchased and abortion cattle. *Veterinary Record*. 176(23):598.
- 204- Rojas M, Vazquez P, Verdier M, Campero C. (2011). Evolución y distribución de las enfermedades de transmisión sexual en bovinos del partido de Rauch, prov. Buenos Aires, años 2001-2009. *Vet Arg XXVII*:1-14.
- 205- Rovere G, Sotelo F, Valena J, Slavica J. (2007). Mejoramiento lechero y el monitoreo reproductivo de los tambos uruguayos [Cd-Rom]. En: IX Congreso Holstein de las Américas; Colonia, Uruguay.
- 206- Saa LR, Perea A, García-Bocanegra I, Arenas AJ, Jara DV, Ramos R, Carbonero A. (2012) Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production* 44(3): 645–649.
- 207- Saizar J. (1998). Estudio serológico de la diarrea viral bovina en bovinos del Uruguay. *Veterinaria* 34: 9–14.
- 208- Sartor IF, Hasegawa MY, Canavessi AMO, Pinckney RD. (2003). Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. *Semina: Ciências Agrárias*. 24:3–10.
- 209- Sanhueza JM, Heuer C, Jackson R, Hughes P, Anderson P, Kelly K, Walker G. (2014). Pregnancy rates of beef cattle are not affected by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* real-time PCR-positive breeding sires in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 62: 237-243.
- 210- Sanhueza JM, Heuer C, West D. (2013). Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*. 112(1-2): 90-98.
- 211- Santos AS, Antoniass NAB, Boabaid FM, Bitencourt APG, Almeida LL, Canal CW, Flores EF, Driemeier D. (2011). Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31: 885–892.
- 212- Schares G, Barwald A, Staubach C, Ziller M, Kloss D, Schroder R, Labohm R, Drager K, Fazen W, Hess RG, Conraths FJ. (2004). Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farms. *Parasitology* 129(3): 301–309.
- 213- Schild C. (2017). Estimación de la tasa de mortalidad anual de terneros y caracterización de los sistemas de crianza en establecimientos lecheros de Uruguay. [Tesis de Maestría]. [Montevideo]: Facultad de Veterinaria, UDELAR. Uruguay.
- 214- Schlafer DH, Foster RA. (2016). “Female genital system”. In: Maxie MG, editor. *Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of Domestic Animals*. 6th edition, Elsevier, vol. 3., p.358-464.

- 215- Schonmann MJ, BonDurant RH, Gardner IA, Van Hoosear K, Baltzer W, Kachulis C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *The Veterinary Record*. 134(24):620-622.
- 216- Schunck B, Kraft W, Truyen U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of virological methods*. 55(3): 427-433.
- 217- SENASA. Indicadores bovinos (2017). Available from: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion>
- 218- Sekiya M, Zintl A, Doherty ML. (2013). Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: a review. *Irish Veterinary Journal*. 66:14.
- 219- Silveira CS, Fraga M, Giannitti F, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F. (2018). Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. *Frontiers in Veterinary Science*. 5: 321.
- 220- Slapeta J, Müller N, Stack CM, Walker G, Lew-Tabor A, Tachezy J, Frey CF. (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *International Journal for Parasitology*. 42(13-14):1143-1149.
- 221- Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P. (2017) Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family Flaviviridae. *Journal of General Virology*. 98(8): 2106–2112.
- 222- Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. (2005). Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Preventive veterinary medicine*. 72(3-4):253-262.
- 223- Ståhl K, Benito A, Felmer R, Zuñiga J, Reinhardt G, Rivera H, Baule C, Moreno-López J. (2009). Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 29(1): 41–44.
- 224- Stella JL, Canabaz F. (1971). El diagnóstico de la vibriosis genital de los bovinos del Uruguay. *Congreso Latinoamericano de Microbiología*. Punta del Este, Uruguay.
- 225- Stoessel F. (1982). Las enfermedades venéreas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Zaragoza: Acribia. 163 p.
- 226- Stynen APR, Pellegrin AO, Fóscolo CB, Figueiredo JF, Canella FC, Leite RC, Lage AP. (2003). Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha-Minas Gerais. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 55(6): 766-769.
- 227- Suarez VH, Miranda AO, Arenas SM, Schmidt EE, Lambert J, Schieda A, Felice G, Imas D, Sola E, Pepa H, Bugnone V, Calandri H, Lordi LV. (2008). Prevalencia de patologías e incidencia de la sanidad en los sistemas bovinos en el este de la provincia de La Pampa, Argentina. *Veterinaria Argentina*. 25:258-280.
- 228- Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. (2011). Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical animal health and Production*. 43(2):367-375.
- 229- Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, Sedinová M, Vanacová S, Vrlík M, Van Ranst M, Flegr J, Kuldaa J. (2002). Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 49(2):154-163.
- 230- Talafha AQ, Hirche SM, Ababneh MM, Al-Majali AM, Ababneh MM. (2009) Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*. 41(4): 499–506.

- 231- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- 232- Tedesco LF, Errico F, Del Baglivi PL. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Australian Veterinary Journal*. 53(10): 470-472.
- 233- Terzolo HR, Argento E, Catena MC, Cipolla AL, Martínez AH, Tejada G, Villa C, Betancor R, Campero CM, Cordeviola JM, Pasini MI. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de campylobacteriosis y trichomoniasis genital bovina. *Anales Com Científ Enferm Ven Bov INTA-Balcarce*. pp.33. 1992.
- 234- Terzolo HR, Paolicchi F, Moreira AR, Homse A. (1991). Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary Record*. 129: 531-532.
- 235- Ury HK. (1975). Efficiency of case-control studies with multiple controls per case: continuous or dichotomous data. *Biometrics*. 31:643-649.
- 236- Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM (2016) Alimentary System. In: Maxie MG (ed). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th edn. Elsevier, Canada, pp 122-128.
- 237- Van Bergen MA, Dingle KE, Maiden MC, Newell DG, van der Graaf-Van Bloois L, van Putten JP, Wagenaar JA. (2005). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(12): 5888-5898.
- 238- Van der Graaf-van Bloois L, Duim B, Miller WG, Forbes KJ, Wagenaar JA, Zomer A. (2016). Whole genome sequence analysis indicates recent diversification of mammal-associated *Campylobacter fetus* and implicates a genetic factor associated with H2S production. *BMC Genomics*. 17(1): 713.
- 239- Van der Graaf-van Bloois L, Miller WG, Yee E, Gorkiewicz G, Forbes KJ, Zomer AL, Wagenaar JA, Duim B. (2016). *Campylobacter fetus* subspecies contain conserved type IV secretion systems on multiple genomic islands and plasmids. *PloS one*. 11: 1-15.
- 240- Van der Graaf-van Bloois L, Miller WG, Yee E, Rijnsburger M, Wagenaar JA, Duim B. (2014). Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires re-evaluation of current diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(12): 4183-4188.
- 241- Van der Graaf-van Bloois L, Van Bergen MA, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*. 95(1): 93-97.
- 242- Vázquez P, Fort M, Baldone V, Fuchs L, Rojas M, Campero C. (2012). Enfermedades de transmisión sexual en La Pampa, Argentina: impacto del plan de control provincial. *Veterinaria Argentina*. 29: 1-6.
- 243- Véron M, Chatelain R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23(2): 122-134.
- 244- Vetanco (2019). <http://www.vetanco.com/es/produto/vedevax-block/>
- 245- Vickers ML, Minocha HC. (1990). Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infection using monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2 :300-302.
- 246- Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT. (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archivos of Virology*. 146(1): 99-115.
- 247- Villamil VV, Ramírez GC, Vera VJ, Jaime JA. (2018). First evidence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) genotype 2 in Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnica*. 65(1): 11-26.

- 248- Wagenaar JA, van Bergen MA, Blaser MJ, Tauxe RV, Newell DG, van Putten JP. (2014). *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease. *Clinical Infectious Diseases*. 58(11): 1579-1586.
- 249- Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(6): 2283-2286.
- 250- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123(3-4):127-138.
- 251- Wapenaar W, Barkema HW, VanLeeuwen JA, McClure JT, O'Handley RM, Kwok OC, Thulliez P, Dubey JP, Jenkins MC. (2007). Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*. 143:166–73.
- 252- Weber MN, Silveira S, Machado G, Groff FHS, Mósená ACS, Budaszewski RF, Dupont PM, Corbellini LG, Canal CW. (2014). High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Reserch*. 191: 117–124.
- 253- Weersink A, VanLeeuwen JA, Chi J, Keefe GP. (2002). Direct production losses and treatment costs due to four dairy cattle diseases. *Adv Dairy Technology* 14: 55-75.
- 254- Wesley IV, Bryner, J. H. (1989). Antigenic and restriction enzyme analysis of isolates of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* recovered from persistently infected cattle. *American Journal of Vetererinary Research*. 50(6): 807-813.
- 255- Weston JF, Williamson NB, Pomroy WE. (2005). Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *New Zealand Veterinary Journal*. 53(2):142–8.
- 256- Winter AJ, Samuelson JD, Elkana M. (1967). A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. *J Am Vet Med Assoc*. 150: 499.
- 257- Wouda W, Dijkstra T, Kramer AMH, Van Maanen C, Brinkhof JMA. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*. 29(10):1677–1682.
- 258- Yao C. (2013). Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *Journal of Medical Microbiology*. 62(1): 1-9
- 259- Yan L, Pace LW, Baughman B, Wilson FD, Zhang S, Zhang MZ. (2016). Failed detection of bovine viral diarrhoea virus 2 subgenotype a (BVDA-2a) on tissue samples due to reduced reactivity of field isolates to raw BVDV antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 28: 150–157.
- 260- Yeşilbaş K, Alpay G, Becher P. (2017) Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. 9(6): 128.
- 261- Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, Briano C, Ashfield N, Silveira CS, Dutra F, Easton C, Fraga M, Giannitti F, Hamond C, Macías-Rioseco M, Menéndez C, Mortola A, Picardeau M, Quintero J, Ríos C, Rodríguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto, Riet-correa F, Buschiazzo A. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 12(9): e0006694.
- 262- Zhao H, Liu H, Du Y, Liu S, Ni H, Wang Y, Si W, Yang J, Ling J. (2010). Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. *Research in Veterinary Science*. 88(3): 446-451.
- 263- Ziech RE, Machado G, Kirinus JK, Libardoni F, Kessler JD, Pötter, L, Vargas AC. (2014). *Campylobacter fetus* in cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ciencia Rural*. 44(1): 141-146.

- 264- Zuerner RL. (2015). Host response to *Leptospira* infection. En: *Leptospira* and Leptospirosis. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 223-250.
- 265- Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo* vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(4):684-691.

13. ANEXOS

13.1. ANEXO 1:

CUESTIONARIO UTILIZADO EN EL TRABAJO NEOSPOROSIS, LEPTOSPIROSIS, CAMPILOBACTERIOSIS, TRICOMONIASIS Y DIARREIA VIRAL BOVINA EN RODEOS LECHEROS DE URUGUAY

● **Identificación:**

INFORME n°:	Fecha:
Nombre del Establecimiento:	
Veterinario o Agrónomo:	
Tel / e-mail:	
Propietario:	
Tel / e-mail:	
Encuestado:	Rol:
Tel / e-mail:	
Localidad y Departamento:	DICOSE:
GEOREFERENCIACION:	
RESPONSABLE:	

● **Datos generales del sistema productivo:**

1- Tipo de explotación (seleccione una opción):

1.1- Tambo bovino solamente ()

1.2- Explotación mixta:

1.2-1. Tambo bovino y agricultura (venta de granos) ()

1.2-2. Tambo bovino y cría bovina (producción de carne) ()

1.2-3. Tambo bovino e invernada/engorde (producción de carne) ()

1.2-4. Tambo bovino, cría bovina e invernada/engorde (producción de carne) ()

1.2-5. Tambo bovino y cría ovina ()

1.2-6. Tambo bovino y otra actividad no incluida arriba () ¿Cuál?

2. El emprendimiento es principalmente:
 - 2.1- Comercial ()
 - 2.2- Familiar con fines comerciales ()
 - 2.3- Familiar para consumo personal únicamente ()
 - 2.4- Otro () ¿Cuál? _____
3. Tamaño del establecimiento:
 - 3.1- Superficie total del establecimiento (hectáreas): _____
 - 3.2- Superficie total del establecimiento dedicada al tambo: _____
4. Número total de animales en el establecimiento? _____
 - 4.1- Vacas (total): _____
 - 4.1.1- Ordeño: _____
 - 4.1.2- Secas: _____
 - 4.1.3- Vaquillonas: _____
 - 4.1.4- Toros: _____
 - 4.1.5- Terneros: _____
5. Razas lecheras presentes en el tambo (seleccione todas las que corresponda):
 - 5.1- Holstein/Holando ()
 - 5.2- Jersey ()
 - 5.3- Otra raza pura () ¿Cuál? _____
 - 5.4- Cruzas (mencione las razas usadas en el cruzamiento) () _____
6. Parámetros productivos:
 - 6.1- Litros de leche producidos por vaca en ordeño por día (promedio del último ciclo productivo): _____
 - 6.2- Relación vaca en ordeño/vaca total (%): _____
 - 6.3- Carga (total de vacas/hectárea): _____
 - 6.4- Litros de leche producidos/hectárea/año: _____
 - 6.5- Litros corregidos a los 305 días de lactancia: _____
 - 6.6- Sólidos totales: Grasa: _____ Proteína: _____
 - 6.7- Nivel de lactosa: Primavera _____ Verano _____ Otoño _____ Invierno _____
7. Destino de la leche producida:
 - 7.1- Venta a industria/cooperativa/usina láctea ()
 - 7.2- Industrialización propia (). En caso de seleccionar esta opción, mencione el/los tipo/s de producto/s lácteo/s producidos: _____
 - 7.3- Otro () ¿Cuál? _____

8. ¿Cuántas veces diarias se ordeñan las vacas?
- 8.1- 1 vez ()
- 8.2- 2 veces ()
- 8.3- 3 veces ()
- 8.4- Más de 3 veces ()
9. En los últimos 3 años, el tambo ha vendido excedentes de:
- 9.1- Terneras (hembras). Si () No ()
- 9.2- Vaquillonas vacías. Si () No ()
- 9.3- Vaquillonas preñadas. Si () No ()
10. Hay perros en el establecimiento? Sí () No () cuantos: Machos_____ Hembras _____
- 10.1- Son: () nacidos en el establecimiento () comprados () adoptados?
- 10.2- Las hembras son castradas? () Sí () No
- 10.3- Trabajan en el campo con las vacas? Sí () No ()
- 10.4- Cuál es la alimentación? _____
- 10.5- Ha observado si los perros comen los restos fetales (feto y/o placenta) y carne de bovinos muertos? Sí () No ()
11. Se observan perros ajenos en el establecimiento? Sí () No ()
12. Ha visto zorros? Sí () No ()
13. Cerca del establecimiento, hay áreas de montes y/o forestal? Sí () No ()
14. Cuando hay muerte de bovinos, cuál es el destino de las carcasas? _____
15. Cuál es la fuente de agua? () bebida/pozo () tajamar () laguna () arroyo/cañada
16. Lleva registro de datos del establecimiento? () Sí () No
- 16.1- Papel () Digital () Programa computadora () ¿Cual? _____
17. Tipo de alimentación:
- 17.1- 100% pastoril ()
- 17.2- 100% estabulado con ración ()
- 17.3- Base pastoril con suplementación (ración) ()
- 17.4- Base de ración con complemento de pastoreo ()
- 17.5- Otro () ¿Cuál? _____
18. Si se usa ración, indique: Comprada () Producida ()
- 18.1- Cuál es la manera de conservación: _____

18.2- Se hace control de roedores: Si () No ()

19. Hay aguadas cerca de los sitios de pastoreo de las vacas? Si () No ()

Manejo Reproductivo:

20.Cuál es el manejo reproductivo del establecimiento?

20.1- Inseminación Artificial: Sí () No ()

20.2- Compran semen: Sí () No ()

20.3- Repaso con toros: Sí () No ()

20.4- Transferencia de embriones: Sí () No ()

20.5- Monta natural: Sí () No ()

20.6- Toros: únicamente usado en este establecimiento () prestado o compartido con otro establecimiento ()

21. Intervalo parto – primer servicio (días): _____

22. Intervalo parto - concepción (media del período de servicio en días):

90 () 120 () 150 ()

Tiene vacas atrasadas (>150): Sí () No ()

23. Número total de animales que fueron ofrecidos al servicio:

Vaquillonas _____ Vacas >1 parto _____

24. Total preñadas: _____

25. Total paridas: _____

26. Número de animales que parieron en el año anterior? _____

27. Duración media de lactación (días): _____

28. Época de los partos:

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC

Problemas en el período Ene. – Dic. 2015:

Pre-parto

29. Número total de vacas que no se preñaron: _____

Cuántas no fueron sometidas al servicio: _____

30. Sobre el celo:

Cuántas tentativas de concepción hasta el descarte: 1 () 2 () 3 () >3 ()

Repetición de celo: 1-5 % () 6-10 % () 11 – 15 % () >15% ()

Intervalo de celos (días): 21 () 30 () 40 () >40 ()

Tasa de abortos %: _____

- Tiempo de gestación (meses): 0 – 3 () 4 – 6 () 7 – 9 ()

Observaciones: _____

–

Posparto

31. Ocurren retenciones de las placentas? Sí () No () N° _____

32. Ocurren metritis? Sí () No () N° _____

33. Ocurren partos distócicos? Sí () No () N° _____

Observaciones: _____

Terneros

34. Se ve muerte durante el parto:

Ninguna () 1-5 % () 6-10 % () 11 – 15 % () >15% ()

35. Se ve mortalidad hasta las 48 horas postparto:

Ninguna () 1-5 % () 6-10 % () 11 – 15 % () >15% ()

Signos clínicos: _____

36. Se ve muerte hasta los 30 días de vida:

ninguna () 1-5 % () 6-10 % () 11 – 15 % () >15% ()

Signos clínicos: _____

37. Hay animales hasta los 2 años con atraso en el crecimiento, menores ganancias de peso, signos clínicos respiratorios y/o dermatitis? Sí () No () N° _____

Observaciones: _____

Registro de las vacas abortadas:

38. Hay diagnóstico de enfermedades abortivas en el establecimiento? Sí () No ()

38.1- Serológico: () Cuál: _____

38.2- Necropsia en fetos: () Cuál: _____

38.3- Raspado en los toros: ()

Cuál: _____

Manejo Sanitario

Vacunación del rodeo contra:	Nombre comercial

13.2. ANEXO 2:

Tabla suplementaria mencionada en el capítulo 4.

Tabla suplementaria 1: Pruebas de diagnósticos auxiliares serológicas y microbiológicas realizadas en los 8 casos de infección por BVDV.

Caso No. (brote No.)	Prueba microbiologica (muestra): resultado	Prueba serologica (muestra): resultado
1 (brote 1)	Cultivo bacteriano selectivo para <i>Salmonella</i> spp. en caldo tetracionato y agar xilosa-lisina-desoxicolato (contenido intestinal) †: negativo.	-
	Inmunohistoquímica para coronavirus bovino (colon) ^o : negativo.	-
2 (brote 2)	Cultivo bacteriano aerobico en agar sangre y agar MacConkey (placenta, pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: no hubo aislados.	MAT para <i>Leptospira</i> serovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hardjo Bovis, Hardjo Prajitno y Wolfii (fluido torácico fetal) ¶: Negativo en una dilución de 1:10.
	Cultivo bacteriano microaerobico en medio Skirrow (placenta, pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: no hubo aislados.	-
	PCR‡ para <i>Leptospira</i> spp. e IFD† (riñón e hígado del feto): negativo.	-
	IFD para <i>Campylobacter fetus</i> (pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: negativo.	-
	Inmunohistoquímica <i>Neospora caninum</i> (cerebro, corazón)†: positivo.	-
	<i>Neospora caninum</i> PCR (cérebro del feto)‡: positivo.	-
	Cultivo para <i>Tritrichomonas foetus</i> en medio Diamond (líquido abomasal del feto)†: negativo.	-
3 (brote 3)	Cultivo bacteriano aerobico en agar sangre y agar MacConkey (intestino, pulmón, linfonodos mesenterico y mediastinico)†: <i>Salmonella enterica</i> aislada de linfonodulo mesentérico e intestino. <i>Escherichia coli</i> aislada de linfonodulo mediastinico.	<i>Salmonella</i> serotipo, Kauffman-White esquema de clasificación (<i>Salmonella enterica</i> cepa aislada de cultivo bacteriano aerobico): <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium.
	RT-PCR para coronavirus bovino (intestino)§: negativo.	-
	RT-PCR para virus respiratorio sincitial bovino (pulmón)*: negativo.	-
	RT-PCR para el virus de la parainfluenza bovina 3 (pulmón)*: negativo.	-
	PCR para el herpesvirus bovino tipo 1 (pulmón)§: negativo.	-
4 (brote 3)	Cultivo bacteriano aerobico en agar sangre y agar MacConkey (intestino, pulmón, linfonodos mesenterico y mediastinico)†: <i>Histophilus somni</i> aislado de pulmón.	-
	RT-PCR para virus respiratorio sincitial bovino (pulmón)*: negativo.	-
	RT-PCR para el virus de la parainfluenza bovina 3 (pulmón)*: negativo.	-
	PCR para el herpesvirus bovino tipo 1 (pulmón)§: negativo.	-

5 (brote 4)	Cultivo bacteriano aerobico y anaerobico en agar sangre, chocolate y MacConkey (riñón, vejiga urinaria, pulmón, hígado, bilis)†: <i>Streptococcus</i> sp. aislado de riñón, <i>Escherichia coli</i> aislada de riñón, vejiga urinaria e hígado.	-
	Cultivo bacteriano selectivo para <i>Salmonella</i> spp. en caldo tetracionato y agar xilosa-lisina-desoxicolato (ciego, bilis)†: negativo.	-
6 (brote 5)	Cultivo bacteriano selectivo para <i>Salmonella</i> spp. en caldo tetracionato y agar xilosa-lisina-desoxicolato (linfonodulo mesentérico, heces)†: negativo.	-
	PCR para <i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i> (ileo, heces)†: negativo	-
	RT-PCR para coronavirus bovino (intestino, heces)§: negativo.	
	RT-PCR para Rotavirus grupo A (intestino, heces)§: negative.	-
7 (brote 6)	Cultivo bacteriano aerobico en agar sangre y agar MacConkey (pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: no hubo aisalmiento de patógenos.	MAT para <i>Leptospira</i> serovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hardjo Bovis, Hardjo Prajitno y Wolfii (fluido torácico del feto)¶: Negativo en una diluición de 1:10.
	Cultivo bacteriano microaerobico en medio Skirrow (pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: no hubo aisalmiento de patógenos.	-
	PCR‡ para <i>Leptospira</i> spp. e IFD† (riñón e hígado del feto): negativo.	-
	IFD para <i>Campylobacter fetus</i> (pulmón, hígado y líquido abomasal)†: negativo.	-
	PCR para <i>Neospora caninum</i> (cerebro del feto)‡: negativo.	-
	Cultivo para <i>Tritrichomonas foetus</i> en medio Diamond (líquido abomasal del feto)†: negativo.	-
	PCR para herpesvirus bovino tipo 1 (pool de órganos)§: negativo.	-
8 (brote 6)	Cultivo bacteriano aerobico en agar sangre y agar MacConkey (placenta, pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: <i>E. coli</i> aislada del pulmón y placenta.	MAT para <i>Leptospira</i> serovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Hardjo Bovis, Hardjo Prajitno y Wolfii (fluido torácico del feto)¶: Negativo en una diluición de 1:10.
	Cultivo bacteriano microaerobico en medio Skirrow (pulmón, hígado y líquido abomasal del feto)†: no hubo aisalmiento de patógenos.	-
	PCR‡ para <i>Leptospira</i> spp. e IFD† (riñón e hígado del feto): negativo.	-
	IFD para <i>Campylobacter fetus</i> (pulmón, hígado y líquido abomasal)†: negativo.	-
	Inmunohistoquímica para <i>Neospora caninum</i> (cerebro)†: positivo.	-
	PCR para <i>Neospora caninum</i> (cerebro)‡: positivo.	-
	PCR para herpesvirus bovino tipo 1 (pool de órganos)§: negativo.	-

IFD: inmunofluorescencia directa. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. RT-PCR: reverse transcriptasa-PCR. MAT: prueba de microaglutinación.

†Pruebas realizadas en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

- ° Pruebas realizadas en el “California Animal Health and Food Safety Laboratory”, University of California, Davis, CA, USA.
- ‡ Pruebas realizadas en el Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
- § Pruebas realizadas en el Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, Salto, Uruguay.
- * Pruebas realizadas en el Laboratorio de Virología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- ¶ Pruebas realizadas en el División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) Miguel C. Rubino, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay.
- ⌘ Pruebas realizadas en el Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

13.3. ANEXO 3

Publicaciones:

- **Diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis in South America:** este trabajo fue publicado en la revista *Frontiers in Veterinary Science*, el artículo se encuentra disponible online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302017/>
- **Estudio comparativo de ELISAs comerciales para detección de anticuerpos en la investigación diagnóstica del aborto asociado a *Neospora caninum* en rodeos de bovinos lecheros de Uruguay:** este trabajo fue publicado en la *Revista Argentina de Microbiología*, el artículo se encuentra disponible online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300835>
- **Diseases associated with bovine viral diarrhea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay:** este trabajo fue publicado en la *Brazilian Journal of Microbiology*, el artículo se encuentra disponible online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=diseases+associated+with+bovine+viral+diarrhea+virus+subtype+1a+and+2b+in+beef+and+dairy+cattle+in+uruguay>
- **Detección de *Tritrichomonas foetus* por PCR en esmegma prepucial de toros en Uruguay:** manuscrito enviado a la Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay.