



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DIAGNÓSTICO, INMUNIDAD Y VACUNACIÓN EN BOVINOS:
AVANCES EN LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN LA
PRODUCCIÓN NACIONAL**

MARÍA LAUREANA DE BRUN MÉNDEZ

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2022



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DIAGNÓSTICO, INMUNIDAD Y VACUNACIÓN EN BOVINOS:
AVANCES EN LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN LA
PRODUCCIÓN NACIONAL**

MARÍA LAUREANA DE BRUN MÉNDEZ

Rodrigo Puentes
Director de Tesis

AÑO
2022



INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Andrés Cabrera; PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay**

**Alejandra Capozzo; PhD
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar-Argentina**

**Fabricio Torres; PhD
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo – Brasil
Laboratorio Axys – Porto Alegre - Brasil**

**AÑO
2022**



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Salud animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Aula 102, 18/05/2022

TRIBUNAL: Dr. Andrés Cabrera, Dra. Alejandra Capozzo, Dr. Fabricio Torres

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4802400-2	María Laureana De Brun Méndez	APROBADO	12

TRIBUNAL

Dr. Andrés Cabrera

Dra. Alejandra Capozzo

Dr. Fabricio Torres

FIRMA

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Montevideo, 18 de mayo de 2022

En el presente trabajo de tesis de doctorado en Salud Animal, titulado “Diagnóstico, inmunidad y vacunación en bovinos: avances en los principales virus que afectan la producción nacional”, la Msc. María Laureana De Brun Méndez profundiza el estudio de la circulación, diagnóstico y evaluación de la generación de inmunidad vacunal en varios virus que afectan la producción bovina nacional.

Mediante un abordaje metodológico acorde al desarrollo de esta tesis, combina un arduo trabajo de campo con un importante trabajo de laboratorio. El trabajo comienza con adecuada descripción de la problemática de las enfermedades virales que afectan la producción bovina nacional, para luego enfocarse en el desarrollo de herramientas que ayuden a mejorar el diagnóstico de la Leucosis Viral Bovina y detectar la circulación del gammaherpes virus tipo 4. Así mismo, realizó una búsqueda exhaustiva de bibliografía, explicando la eficiencia y títulos necesarios que tendrían que producir las vacunas para que estas sean eficientes en la generación de ac para IBR y DVB y que factores podrían afectar los mismos.

Los métodos utilizados en estas tesis son adecuados a los objetivos planteados, y la bibliografía citada es completa y actualizada. Los resultados obtenidos se presentan en cuatro capítulos y en formato de publicaciones científicas y permiten cumplir con los objetivos planteados. Este trabajo ha realizado contribuciones muy relevantes para las ciencias veterinarias y fueron publicados en revistas arbitradas. Los mismos contribuyen a mejorar el diagnóstico en varias enfermedades virales, insumo que permitirá ser aplicado en las estrategias de control. Se destaca la implementación de un método molecular de última generación en la detección de la carga viral de Leucosis Bovina. Así como, la detección de la circulación del herpes virus 4 bovino en Uruguay. En cuanto a la evaluación de las vacunas comerciales de un IBR y DVB y la interferencia con las vacunas de otros patógenos, se desprende un gran aporte para orientar a los productores sobre el uso y las combinaciones de las mismas. En este sentido logro visualizar una tendencia en la diferencia de la respuesta inmune frente a la generación de anticuerpos vacunales de un grupo de vaquillonas BLV positivas comparado con un grupo de vaquillonas BLV negativas.

En las consideraciones generales se destaca la implementación de técnicas moleculares transferibles para el diagnóstico y generación de conocimiento e insumos de relevancia para el diseño y desarrollo de estrategias de control de las diferentes enfermedades virales. A su vez se destaca que la tesis es original y los resultados constituyen un aporte nuevo y significativo al conocimiento científico tanto desde el punto de vista básico como aplicado, generando conocimiento a la academia, pero aún más importante al día a día del productor en el uso y aplicación de las vacunas frente a los diferentes virus.

La presentación oral de su trabajo se desprende un gran conocimiento, fue muy clara y ordenada y contribuye al entendimiento del trabajo experimental realizado. Asimismo, pudo responder con solvencia las preguntas realizadas por el tribunal reflejando un amplio manejo del tema. Por lo que antecede, este tribunal acuerda por unanimidad otorgar a esta tesis la calificación máxima Aprobado 12.



Alejandra Capozzo



Andrés Cabrera



Fabricio Torres

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el largo camino y recompensa de mis padres, Juan y Odilia. Por su ayuda en cada experimento de campo que surgiera, por su esfuerzo de años y por el cariño incondicional, GRACIAS.

Para Tin, quien me acompaña en todas mis locuras, me apoya cuando parece todo derrumbarse, sin dudas ya casi es experto en el tema, convirtiéndose en un científico más.

Para mi tutor, Rodrigo, ya lleva más de 10 años (13) de enseñanzas y consejos para transformarme en una investigadora. Además de ser un referente se convirtió en un gran amigo.

Para mis tesistas, Valentina, Florencia, Lucía y Cecilia sin dudas su apoyo y trabajo fue fundamental en esta tesis doctoral.

Valentina, mi primer estudiante CIDEDEC, gran compañera de salidas de campo y de mesada, y la mejor planillera.

Florencia, con su constancia y dedicación a las infinitas seroneutralizaciones.

Para Mauro, compañero de proyecto, de horas de laboratorio y de las mejores meriendas en cantina de Fvet.

Para todos mis compañeros de la Unidad de Microbiología y la Unidad de Inmunología e inmunoterapia, gracias por su apoyo incondicional, y por formar un grupo humano solidario.

Para Agustín Furtado, gracias por siempre estar a disposición para lo que precisemos.

Para todos los estudiantes que me acompañaron en las actividades de campo con largas jornadas de muestreos.

Para el campo de recría que abre sus puertas para las investigaciones desde mi tesis de grado, gracias a Tiky Sacco y todo el personal del establecimiento.

Para los investigadores que han formado parte de mi formación y de las publicaciones, mejorando ampliamente cada artículo publicado.

A la Facultad de Veterinaria y el programa de posgrados por todas las oportunidades de aprendizaje.

A la ANII y CSIC por los proyectos financiados.

A la comisión académica de posgrados (CAP) por la beca otorgada.

A todos muchas gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	V
SUMMARY	VI
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivos generales.....	7
3.2 Objetivos específicos	7
4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	8
4.1 Experimento número 1:	8
4.2 Experimento número 2:	20
4.3 Experimento número 3:	29
4.4 Experimento número 4:	41
4.4.1 Materiales y métodos del experimento 4.....	41
Caracterización del establecimiento y medidas de manejo	41
Toma de muestras.....	41
Conformación de grupos	42
Hemograma	42
Detección de anticuerpos neutralizantes mediante seroneutralización in vitro contra BoHV-1	42
Detección de anticuerpos mediante ELISA contra BoHV-1	43
Detección de anticuerpos totales mediante ELISA contra BVDV	43
Detección de antígeno contra BVDV	44
Detección del virus BVDV mediante PCR	44
Determinación de la carga proviral mediante ddPCR	44
Detección de agentes etiológicos en abortos bovinos	45
Elaboración de registros y análisis de resultados	45
4.4.2. Resultados del experimento 4.....	45
Prevalencia serológica de BLV en el rodeo	45
Anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1.....	46
Anticuerpos totales e isotipos contra BoHV-1	47
Anticuerpos totales para BVDV y prevalencia de animales persistentemente infectados en el rodeo	50
Agentes etiológicos diagnosticados en los abortos bovinos	50
Performance reproductiva de las vaquillonas.....	50
Carga proviral y respuesta inmune de las vaquillonas contra BoHV-1.....	51
4.4.3 Discusión del experimento 4	53

5. COMENTARIOS GENERALES	61
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7. ANEXO	72

RESUMEN

Los problemas sanitarios en el sector lechero, son un factor clave para el desarrollo eficiente de la producción, ocupando las enfermedades infecciosas un lugar destacado en ese sentido. Leucosis bovina enzoótica (BLV), Diarrea viral bovina (BVD) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), son las enfermedades virales más importantes en la lechería del Uruguay que aún siguen desatendidas. El objetivo general de esta tesis doctoral fue estandarizar nuevas técnicas de diagnóstico para Leucosis Bovina Enzoótica y Herpesvirus Bovino y analizar la respuesta inmune de los animales, así como la interacción entre las principales virosis que afectan el sector lechero nacional. En el primer artículo de esta tesis (**Artículo I**) se desarrolló una técnica con alta sensibilidad y especificidad para la detección y cuantificación del virus de la Leucosis bovina (BLV). La misma es *droplet digital* PCR, una PCR de última generación que permite la detección de bajas cargas provirales y la detección temprana de nuevas infecciones por BLV. Por otro lado, se estandarizó una *nested* PCR para la detección del *gammaherpesvirus* tipo 4 (BoHV-4), obteniéndose la primera detección en nuestro país tanto serológica como molecular de este virus (**Artículo II**). BoHV-4 se caracteriza por causar múltiples afecciones, destacándose su impacto en el sistema reproductivo. Asimismo, referido a las virosis de interés reproductivo en nuestro país, se realizó la evaluación de la respuesta inmune humoral de 4 vacunas comerciales para IBR y la combinación de las mismas con vacunas clostridiales y contra el virus de la Fiebre Aftosa. Se destaca que solo una vacuna generó niveles de anticuerpos neutralizantes considerados protectores en la mayoría de los animales (86%), habiendo por otra parte vacunas que no lograron estimular a ningún animal 30 días luego de la segunda inmunización. No encontramos interferencias estadísticamente significativas en la inmunización simultánea con vacunas clostridiales o contra la Fiebre Aftosa y se logró una respuesta intermedia utilizando dos marcas distintas del inmunógeno, prácticas habituales a nivel de campo (**Artículo III**). En un último experimento, se evaluó la respuesta inmune de vaquillonas naturalmente infectadas con el BLV a la inmunización a campo contra los virus BoHV-1 y BVDV y su desempeño reproductivo. No se determinaron diferencias estadísticas entre la respuesta inmune a BoHV-1 entre animales infectados con BLV y animales serológicamente negativos. En cuanto al porcentaje de preñez, no se encontraron diferencias entre el status a BLV, ni con la condición de estar o no vacunadas para enfermedades reproductivas. Por último, se contribuyó en el conocimiento de la sanidad de un rodeo típico de cría de vaquillonas Holando de nuestro país. Donde se destacó: la alta prevalencia al BVDV, la presencia de animales persistentemente infectados y de animales jóvenes con linfocitosis persistente, así como la circulación conjunta de virosis inmunosupresoras, enfermedades bacterianas y protozoarias. En resumen y como consecuencia de la ejecución de esta tesis, se obtuvieron por un lado productos tecnológicos nacionales transferibles al sector y por otro lado se contribuyó con información sobre estas enfermedades, proporcionando avances para posibles estrategias de control aplicables al Uruguay.

SUMMARY

Sanitary issues in dairy farms are a key factor for the effective development of production. In this regard, infection diseases play a major role. Although Bovine Enzootic Leukemia (BLV), Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), are the main viral diseases of dairy farms in Uruguay, they have not been properly addressed by the scientific community and dairy operations. Thus, the main objectives of this doctorate thesis was to standardize new techniques for diagnosing Bovine Leukemia Virus and bovine herpesvirus, to analyze the animal's immune response, and to evaluate the interaction between the main viruses affecting productivity in dairy farms. In the first article (**Article I**) of this dissertation, a technique with high sensitivity and specificity for the detection and quantification of the BLV was developed. This technique consists on using a *digital droplet* PCR, the novel PCR generations. Digital PCR allows the detection of low proviral loads, and consequently the early detection of new BLV infections. In addition, a *nested* PCR was standardized for the detection of *gamma herpesvirus* type 4 (BoHV-4), developing, for the first time in our country, a serological and molecular diagnostic test for BoHV-4 (**Article II**). BoHV-4 causes multiple affections, highlighting its impact on bovine reproductive function. Further, in regard to the main reproductive viruses in our country, the humoral immune response was evaluated for 4 commercial IBR vaccines, and their combination with vaccines for Clostridia and Foot and Mouth Disease. Interestingly, only one of the vaccines generated high levels of neutralizing protective antibodies in most animals (86%). In addition, some vaccines were not able to induce immune response in any animal 30 days after the second immunization. Any significant interference statistically was found, when simultaneous immunization with clostridial vaccines or Foot and mouth disease virus vaccines were given. Finally, an intermediate response was found when using two different commercial brands, which is a common practice in dairy farms (**Article III**). In the final experiment, the immune response of BLV naturally infected heifer's field immunization against BoHV-1 and BVDV viruses was evaluated, as well as its reproductive performance. Statistical differences were not determined in the immune response to BoHV-1 between BLV infected animals and serologically negative animals. In regard to pregnancy rates, no differences were found between BLV status or vaccination status against reproductive diseases. In conclusion, this dissertation has generated knowledge regarding the health of a typical heifers Holstein rearing herd in our country. Highlighting the high prevalence of BVDV, the presence of animals persistently infected, young animals with persistent lymphocytosis, as well as the concomitant circulation of immunosuppressive viruses, bacterial, and protozoa diseases. To summarize, and as a consequence of the execution of this thesis, national technological products were obtained and transferred to the agricultural production. In addition, this dissertation provides valuable information about the diseases studied which may result in the development of control strategies for disease prevention in Uruguay.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 16 contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en cada sangrado post-vacunación y según status contra BLV, mediante <i>Seroneutralización in vitro</i>	46
Figura 1	Cinética de anticuerpos totales contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) para animales vacunados y no vacunados, mediante ELISA a lo largo del ensayo	47
Figura 2	Cinética del título de anticuerpos totales contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados y según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo	48
Figura 3	Cinética del título de anticuerpos (isotipos IgG1 e IgG2) contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados y según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo	49
Figura 4	Porcentaje de preñez histórico desde 2002 a 2019. Se diferencia en el periodo de estudio entre animales vacunados y no vacunados con vacuna reproductiva polivalente.	51
Figura 5	Cinética del título de anticuerpos (isotipos IgG1 e IgG2) contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados y según carga proviral para BLV, mediante ddPCR a lo largo del ensayo	52

Artículos científicos publicados en el marco de la tesis doctoral:

- I- **De Brun, M. L.**, Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., Panei, C. J., & Puentes, R. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 10406387221085581. Advance online publication. <https://doi.org/10.1177/10406387221085581>
- II- **De Brun Laureana**, da Silva Valeria, Castro Cecilia, Rivero Lucía, Mionetto Marcos, Rodríguez Federico, Campos Fabricio, Puentes Rodrigo. Detección de herpesvirus bovino 4 (BoHV-4) en rodeos lecheros de Uruguay. *Veterinaria (Montev.)* (2020) Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092020000101202&lng=es. Epub 01-Jun-2020. <http://dx.doi.org/10.29155/vet.56.213.3>
- III- **De Brun L**, Leites M, Furtado A, Campos F, Roehe P, Puentes R. Field Evaluation of Commercial Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (Ibr) Virus Using Different Immunization Protocols. *Vaccines (Basel)*. (2021) Apr 20;9(4):408. [doi:10.3390/vaccines9040408](https://doi.org/10.3390/vaccines9040408). PMID: 33924141; PMCID: PMC8074307.

Poster en congresos publicados con resultados de la tesis doctoral:

- i. Florencia Steffanía Ruppel Funes, **María Laureana De Brun Méndez**, Rodrigo Puentes. Determinación de la respuesta inmune humoral a campo frente a la vacunación contra rinotraqueítis infecciosa bovina en vaquillonas infectadas con el virus de la leucosis. I Congreso de Microbiología Veterinaria: La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2021.p321
- ii. Valentina Skuras, **María Laureana De Brun Méndez**, Paulina Meny, Felipe Schelotto, Rodrigo Puentes. Diagnóstico de agentes etiológicos causantes de aborto en un rodeo de vaquillonas Holando de un campo de recría en Uruguay. I Congreso de Microbiología Veterinaria: La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2021.p365

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud en el sector lácteo, especialmente las enfermedades infecciosas, impactan directamente en la producción de leche (Tiwari et al., 2007; Erskine et al., 2012). Leucosis bovina enzoótica, Diarrea viral bovina (BVD) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), son las tres enfermedades virales más importantes en la lechería del Uruguay. Muchos países han controlado o erradicado estas enfermedades, lo que hace pensar que las mismas podrán tener efecto sobre el comercio internacional de productos agroexportables. Uruguay exporta más del 70% de la leche que produce, 2200 millones de litros anualmente, siendo el séptimo exportador de leche a nivel mundial (<https://www.inale.org/uruguay-lechero/>). Por lo tanto las enfermedades productivas y reproductivas que afecten los rodeos impactan directamente en la economía del país y por tales motivos integran la lista de enfermedades primordiales para nuestro país desde el año 2009, donde el Plan Nacional de Salud Animal (actualmente llamado CCISA - Comité coordinador de investigación en salud animal), realizó una serie de recomendaciones sobre investigaciones y acciones en salud animal, en base a un gran número de encuestas realizadas a productores vinculados al sector. Dentro de los resultados obtenidos y las sugerencias propuestas de donde el país debería focalizar sus esfuerzos de investigación, aparecen la Leucosis bovina enzoótica y las enfermedades reproductivas, entre otras.

El virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV) es un *Deltaretrovirus* considerado una de las principales virosis que afecta el rodeo lechero en Uruguay, con prevalencias serológicas muy altas, incluso en animales jóvenes (Puentes et al. 2016b). El virus afecta células de la línea linfoide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie, además de monocitos y macrófagos (Kabeya et al., 2001; OIE, 2018). Una vez ocurrida la infección, el virus permanece en el animal de por vida y en un 90% de los casos de forma asintomática, generando disturbios importantes en el sistema inmune (Blagitz et al., 2017). Esto predispone la aparición de enfermedades (Emanuelson et al., 1992; Watanabe et al., 2019), una respuesta limitada frente a la inmunización contra otros patógenos (Puentes et al. 2016a; Frie et al. 2017) disminución en la producción láctea y aumento de los refugos de animales (Bartlett et al., 2013) e incluso se ha visto correlación negativa con la reproducción (Puentes et al. 2016b; VanLeeuwen et al. 2010). Es discutido si BLV causa efecto directo en la reproducción, aunque nuestro grupo encontró una disminución en la tasa de concepción del 26% en animales infectados con BLV ($p=0.005$) (Puentes et al., 2016b). A su vez en otra tesis de grado del grupo, se evaluó si existe alguna relación entre BLV y la respuesta inmune natural de bovinos contra enfermedades de la reproducción, determinándose una asociación entre ser seropositivo al BLV y presentar anticuerpos contra herpesvirus bovino tipo 1) y *Leptospiras spp* (datos aún no publicados), complementando las investigaciones existentes que demuestran el efecto negativo de BLV sobre aspectos reproductivos y sanitarios (Erskine et al., 2011; Puentes et al., 2016b; VanLeeuwen et al., 2010). BLV causa inmunodepresión y también genera disturbios inmunológicos a nivel de la inmunidad celular, modificando el perfil de las células T, claves en la regulación del sistema inmune tanto en infecciones naturales como en respuesta a vacunaciones. Se encontró que vacas infectadas con BLV tuvieron un menor título de IgG2 contra *E. coli* J5 (vacuna contra la mastitis) (Erskine et al., 2011). Sumado a esto, nuestro grupo encontró una menor producción de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa en bovinos infectados naturalmente con BLV e inmunizados a campo en los primeros 15 días posvacunación (Puentes, et

al., 2016a).

Se ha visto que los animales seropositivos en fases tempranas de la infección, desarrollan una respuesta celular con predominio de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), con producción de interferón gamma y consecuentemente síntesis sobre todo de IgG2. Esta subclase de inmunoglobulina, presenta algunas ventajas en sus funciones biológicas si se compara con IgG1. Se ha visto que posee capacidad de aglutinación de antígenos, que no posee la IgG1 (Tizard, 2000). Sin embargo, en fases más crónicas con presencia de linfocitosis persistente (LP), se modifica el perfil de inmunidad y se produce una respuesta con predominio Th2, generando citoquinas típica de ese perfil como ser IL4, IL5, IL10. Consecuentemente hay un cambio de subclase de IgG, prevaleciendo ahora las IgG1 (Yakobson et al., 1998). Las alteraciones en la expresión de citoquinas mostraron estar correlacionadas con la progresión de la enfermedad en infecciones crónicas por retrovirus, sugiriendo que el balance de las citoquinas puede contribuir a la progresión de la enfermedad (Pyeon et al., 1996; Yakobson et al., 1998). Además, se ha visto que los animales infectados con BLV, presentan menor proporción de población de linfocitos T y con capacidad de proliferación *in vitro* reducida. Las células T infectadas con el virus, favorece la expresión de receptores inmunoinhibitorios, lo que aumenta la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo, aumentando la expresión de IL-10 o disminuyendo la de INF gamma. La expresión de los receptores inmunoinhibitorios está correlacionado positivamente con la carga proviral (Bartlett et al., 2014).

Otro aspecto a considerar y que ha causado preocupación en los últimos años, son evidencias de algunos grupos de investigación en cuanto a la asociación positiva de BLV y el cáncer de mamá en mujeres, manteniendo abierta la posibilidad de que se trate de un virus zoonótico (Gao et al., 2020). Finalmente, y para los países con importante tradición en la exportación en pie de vaquillonas como lo es Uruguay, la Leucosis bovina ha significado además una de las principales barreras que ha condicionado los precios y mercados para la exportación desde hace ya varias décadas. Esto ha favorecido también de alguna manera la segregación y acumulación de animales seropositivos, que hoy se estiman en prevalencias que rondan el 70 a 90% (Riet Correa et al., 2019). A todo esto, se suma además el hecho de que actualmente existen aproximadamente 25 países que han eliminado el virus de sus rodeos, generando una tendencia de control y erradicación global que puede traer consecuencias en el futuro a mediano y largo plazo.

En otro plano y más precisamente del punto de vista reproductivo, otras dos enfermedades virales que causan gran impacto en la producción lechera, son el Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) agente de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y el Pestivirus, agente de la Diarrea Viral Bovina (BVD). Ambas enfermedades presentan alta seroprevalencia en nuestro país, superando el 90% a nivel de establecimientos y un 40 a 60% a nivel individual (Guarino et al., 2008; Repiso et al., 2005). Se conoce desde hace mucho tiempo el importante efecto inmunosupresor de BVD en los rodeos (Al-Kubati et al., 2021), fundamentalmente en presencia de animales persistentemente infectados - PI y las pérdidas reproductivas (embrionarias, repetición de celos y abortos en distintas etapas de la gestación), causadas por ambos virus (Yarnall & Thrusfield, 2017). Es importante resaltar brevemente esa condición de PI mencionada para BVD, ya que es muy particular en su patogénesis y se basa en la generación de terneros inmunotolerantes al virus, por haberse infectado durante la etapa de la educación tímica. Estos animales pueden nacer normales y ser asintomáticos y representan el 1 a 2% de los animales en un rodeo. El problema de estos animales es que excretan enormes cantidades de virus y de forma constante a lo

largo de su vida, repercutiendo precisamente en los índices reproductivos del rodeo de cría (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017; Volker Moennig & Becher, 2018). Por lo tanto, la solución que han implementado exitosamente los países para evitar las pérdidas causadas por estos animales, es su identificación y eliminación del rodeo. Esta estrategia es fundamental, aun utilizando vacunas sistemáticamente. Se ha visto que la vacunación como única estrategia de control, sin eliminación de los animales PI, presenta limitantes en su eficacia por la alta carga viral excretada por estos animales (Toker et al., 2020).

En lo que respecta a IBR, es causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) considerado uno de los patógenos virales más importantes para el ganado bovino, (Muylkens et al., 2007). Su principal impacto lo encontraremos en los disturbios reproductivos que genera, destacándose entre ellos la mortalidad embrionaria, repetición de celos a intervalos irregulares, mortalidad fetal y aborto, además de infecciones genitales que culminan en vulvovaginitis y cervicitis (Biswas et al., 2013). A pesar de la alta seroprevalencia y el sólido conocimiento internacional sobre las importantes pérdidas que genera este virus (Muylkens et al., 2007), no se conoce en Uruguay cuál es el impacto de la infección en los rodeos lecheros y por ende no existe un plan nacional de control. En este sentido, el único ensayo de infección experimental realizado con bovinos a campo, con el fin de evaluar el impacto de la circulación de BoHV-1 en ganado de cría, fue realizado por investigadores de nuestro grupo de trabajo, obteniendo resultados significativos que demostraron un retraso de 60 días en la concepción causada por la presencia del virus (Alonzo et al., 2012).

La vacunación para estos virus (VBVD y BoHV-1) en el país no es obligatoria, pero se realiza desde hace varias décadas. Para controlar las mismas en los rodeos, existen diversas vacunas comerciales. En el Uruguay solamente está permitido el uso de vacunas convencionales a virus inactivado, aprobadas oficialmente por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a partir del año 1996. Se utilizan estratégicamente en establecimientos donde existen fallas reproductivas a como preventivo en algunos casos. Además, desde punto de vista comercial, no existen restricciones en el mercado para la exportación de animales seropositivos ya sea por vacunación o enfermedad. La medición de los niveles de IgG1 e IgG2 específicos contra BoHV-1 y BVDV en suero, permite conocer de forma indirecta la respuesta celular inducida luego de la vacunación. Es así que altos títulos de IgG1 están relacionados a una respuesta con un perfil Th2, mientras que altos niveles de IgG2 están relacionados a un perfil Th1 (Heriazon et al., 2011; Spilki et al., 2012). En un trabajo donde relacionaron los niveles de IgG2 e IgG1 con la reducción de la excreción viral, se observó que independientemente del adyuvante utilizado en las vacunas, los animales que tenían al momento del desafío viral niveles de la relación IgG2/IgG1 mayor a 1, fueron los animales que presentaron menor número de excreción viral (Romera, 2001).

En países vecinos como Brasil, se han realizado estudios en donde se evalúa la respuesta a las vacunas frente a BVDV y BoHV-1, obteniendo como resultados una casi indetectable inmunogenicidad generada por estas para BVD (Anziliero et al., 2014). Este mismo resultado fue también obtenido en el Sector de Virología de la UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina, RS. Brasil), en donde tres vacunas comerciales contra el BVDV fueron testeadas y únicamente se obtuvieron títulos en un pequeño grupo de animales y estos eran bajos (Flores, 2018). Por otro lado se pudo establecer que diferentes vacunas para BoHV-1 generaron respuestas con títulos neutralizantes aceptables (Anziliero et al., 2014). En 2017 un meta-análisis concluyó

que la vacunación (tanto con vacunas virales vivas modificadas como inactivadas) contra el BoHV-1 disminuyó el riesgo de aborto en un 60%, confirmando el beneficio de incluir este método como un componente más en el programa de salud de los rebaños (Newcomer, et al., 2017b). Si bien algunas de estas vacunas han demostrado ser eficaces, en la práctica no se tiene en cuenta muchas veces la presencia de BLV como enfermedad inmunosupresora/inmunomoduladora, pudiendo disminuir la eficacia de la vacunación y la protección del rodeo así como del propio BVDV como inmunosupresor por sí mismo. Hasta el momento no existen en nuestro país estudios que midan la respuesta inmune generada por las vacunas que se utilizan, y tampoco en relación con el estado serológico para BLV.

Por otro lado, relacionado con enfermedades de interés reproductivo, se presenta el gammaherpesvirus tipo 4 (BoHV-4). El mismo es de distribución mundial y ha sido aislado de bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis y de animales aparentemente sanos en diferentes partes del mundo poniendo de manifiesto el riesgo que podría representar para la salud pública. Si bien no se ha reconocido como agente causal de una entidad patológica en particular, se asocia principalmente con infecciones del tracto reproductivo de los bovinos (Morán et al., 2015). La infección latente que desarrolla es una herramienta de supervivencia del virus. En algunas ocasiones se ha visto que se establece latencia en células de la línea monocítica, como también en tejidos del sistema nervioso periférico y / o central (Campos et al., 2014). Según algunos autores Donofrio et al., 2009; Kruger et al., 2015; Verna et al., 2012, este virus infecta las células mononucleares de la sangre y presenta tropismo específico por endotelio vascular, tejido mamario, endometrio y tejidos fetales. El BoHV-4 cobra cada vez más importancia en los problemas reproductivos debido a que, junto a su capacidad patológica, predispone la aparición de otras enfermedades (Chastant-Maillard, 2013). Su impacto negativo en el rendimiento reproductivo ha sido sugerido por un estudio epidemiológico donde se puede ver que la seroprevalencia contra BoHV - 4 es mayor en hembras abortadas y en los cuadros de repetición de celo respecto a hembras que no presentan problemas reproductivos (Cvetojević et al., 2016). Pero se desconoce la presencia del virus gammaherpes bovino 4 a nivel nacional y cuál es el impacto que el mismo puede tener en la salud animal. Los resultados de esta tesis, es entonces el primer estudio de BoHV - 4 en nuestro país.

En cuanto al diagnóstico de las enfermedades, es otro punto importante en los planes de control de enfermedades. En lo que respecta al diagnóstico de estas tres enfermedades (IBR, BVD y BLV), se puede decir que la principal estrategia es la detección de anticuerpos mediante ELISA o Seroneutralización *in vitro* (para IBR y BVD) y el uso de pruebas moleculares como la PCR para la detección directa del agente (OIE, 2018). En lo que respecta a BLV la carga proviral varía entre los animales infectados y tiende a aumentar a medida que progresa la enfermedad y también se ha visto que la capacidad de transmisión viral disminuye significativamente en animales con baja carga proviral (Juliarena et al., 2007). Esto puede ser muy útil y relevante a la hora de implementar programas de control de la infección en rodeos lecheros, mediante monitores estratégicos. Es así que la técnica de *droplet digital* PCR (ddPCR) es una herramienta altamente sensible, desarrollada para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Permite detectar pequeñas diferencias porcentuales y cuantificar variantes raras (Hayden et al., 2013; Pinheiro-de-Oliveira et al., 2018; White et al., 2012), presentando ventajas importantes en comparación con las herramientas existentes (Inmunodifusión en gel agar (IDGA), ELISA, nPCR, *Real time* PCR) para

el diagnóstico de las virosis. En BLV, las técnicas de laboratorio son determinantes a la hora de diagnosticar animales infectados de forma subclínica ya que representan el 90% de los infectados por este virus, especialmente aquellos que presentan infecciones recientes o que tienen baja carga proviral. Partiendo de los antecedentes mencionados y la necesidad creciente de un diagnóstico precoz y preciso de la enfermedad para disminuir su transmisión y las pérdidas productivas indirectas asociadas a esta enfermedad y realizar control mediante segregación de rodeos, fue cometido de esta tesis doctoral aplicar la ddPCR para la detección y cuantificación de la forma proviral de BLV en animales naturalmente infectados y comparar los resultados con los obtenidos utilizando técnicas de referencia para la OIE (IDGA, ELISA, nPCR).

2. HIPÓTESIS

2.1 La droplet digital PCR (ddPCR) permite detectar más precozmente la presencia del ADN (provirus) del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (BLV) en animales naturalmente infectados en comparación con las técnicas existentes, logrando además una cuantificación con alta reproducibilidad y precisión.

2.2 El herpesvirus tipo 4 (BoHV-4) está presente en rodeos del Uruguay en animales asintomáticos con o sin antecedentes de pérdidas reproductivas.

2.3 Las vacunas comerciales contra BoHV-1 comercializadas en Uruguay presentan alta inmunogenicidad cuando son aplicadas a campo, resultando en un nivel suficiente de anticuerpos protectores frente a la exposición natural.

2.4 La respuesta inmune humoral en animales vacunados durante el pre servicio contra el virus de la Diarrea viral bovina y el virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina en términos cualitativos y cuantitativos difieren cuando los animales están infectados con BLV.

2.5 La performance reproductiva está afectada negativamente en animales con alta carga proviral de BLV y/o respuestas de anticuerpos bajas contra los virus de la Diarrea viral bovina y Rinotraqueitis infecciosa bovina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Estandarizar nuevas técnicas de diagnóstico para Leucosis Bovina Enzoótica y Herpesvirus Bovino y analizar la respuesta inmune de los animales, así como la interacción entre las principales virosis que afectan el sector lechero nacional.

3.2 Objetivos específicos

1. Puesta a punto de la *droplet digital PCR* (ddPCR) para el provirus del BLV y comparación en su capacidad diagnóstica con otras técnicas recomendadas por la OIE.
2. Determinar la presencia de BoHV-4 en rodeos del Uruguay.
3. Evaluar la inmunogenicidad de cuatro vacunas comerciales contra BoHV-1 utilizadas en nuestro país.
4. Evaluar la respuesta inmune humoral a campo frente a la vacunación contra IBR y BVDV en hembras bovinas y su relación con la infección con BLV.
5. Determinar la carga proviral de BLV en vaquillonas infectadas naturalmente y analizar su relación con la tasa de preñez obtenida.
6. Asociar la respuesta inmune humoral frente a IBR y BVDV con la performance reproductiva de los animales inmunizados a campo.

4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis doctoral se divide en cuatro experimentos, dos dedicado a diagnóstico y otros dos a la respuesta inmune en bovinos. En el primer experimento, se busca responder las siguientes interrogantes: ¿Es la *droplet digital* PCR (ddPCR) una herramienta aplicable para la detección y cuantificación de BLV? ¿Presenta la ddPCR mayor sensibilidad para detectar la infección por BLV? Para responder estas preguntas, se estandarizó una ddPCR para la detección de una porción del gen que codifica para la glicoproteína gp51 del BLV, analizando su sensibilidad mediante infección experimental en ovinos y en la detección y cuantificación de bovinos naturalmente infectados. En el segundo experimento, se buscó responder las interrogantes: ¿Está presente el BoHV-4 en bovinos de nuestro país? Se estandarizó una *nested* PCR para la detección de BoHV-4 y mediante técnicas serológicas de ELISA se estableció la seroprevalencia de herpesvirus tipo 1, 4 y BVDV en los rodeos estudiados. En el tercer experimento, se buscó responder las interrogantes: ¿Las vacunas utilizadas actualmente en la inmunización de los rodeos de Uruguay, son capaces de generar títulos de anticuerpos neutralizantes contra el BoHV-1 suficientes para otorgar protección?, ¿Existen diferencias entre la inmunidad generada por diferentes vacunas comerciales utilizadas en Uruguay?, ¿La presencia de otros agentes infecciosos en vacunas polivalentes aplicadas simultáneamente con BoHV-1 (BoHV-1 + vacuna contra Fiebre Aftosa o BoHV-1 + clostridiales), influye en el desarrollo de inmunidad de los animales contra BoHV-1? En este experimento se realizaron diferentes protocolos de inmunización con vacunas comerciales disponibles en Uruguay y se evaluó la respuesta inmune mediante las técnicas de seroneutralización (SN) y ELISAs desarrollados en nuestro laboratorio para los diferentes isotipos de inmunoglobulina G. En el cuarto experimento, se buscó responder las siguientes interrogantes: ¿Las hembras bovinas libres de la infección con BLV generan a campo una respuesta inmune humoral significativamente mayor que los animales infectados frente a la vacunación contra IBR y BVDV? ¿Impacta la infección por BLV y/o la carga proviral en los porcentajes de preñez? Para esto se inmunizaron grupos de vaquillonas Holando BLV+ y BLV- y se evaluó la respuesta inmune generada mediante SN *in vitro*, ELISAs y carga proviral mediante ddPCR, técnicas desarrolladas en experimentos anteriores. Además, se realizó un seguimiento reproductivo de los animales y ante la causal de abortos, se procedió al diagnóstico etiológico de las causas de los mismos.

4.1 Experimento número 1:

“Puesta a punto de la *droplet digital* PCR (ddPCR) para el provirus del BLV y comparación en su capacidad diagnóstica con otras técnicas recomendadas por la OIE. (Artículo científico N° I)”

Animales y protocolo experimental



- A) La infección experimental con BLV se llevó a cabo en un modelo ovino (Porta et al., 2019). Se utilizaron 6 animales de un establecimiento comercial con producción ovina del departamento de Florida. Se infectaron 4 hembras *Corriedale* adultas (aproximadamente 2 años) administrando una inyección IM con 1 ml de solución de infección (10 µL

de sangre completa de una vaca infectada naturalmente con BLV+ diluidos en 1 mL de PBS) y se usaron otras 2 ovejas como controles no infectados mantenidos en las mismas condiciones. Se tomaron muestras de sangre (15 mL) con aguja 19 G de la vena yugular de cada animal en tubos con y sin EDTA para obtener ADN y suero a los 0, 2, 6, 9, 13, 21, 30 y 60 días post -infección (dpi). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético en el Uso de Animales (CEUA-FVET- Exp. 111900-000572-20).

- B) Infección natural con BLV:** Se utilizaron vaquillonas Holando (n = 34), pertenecientes a un campo de recría de ganado Holando del Uruguay. Las mismas fueron analizadas previamente para anticuerpos contra BLV cada 3 meses durante 12 meses por ELISA y nPCR en el tiempo 0 y 12 meses para obtener los grupos de BLV positivo y BLV negativos. Se tomaron muestras de sangre (10 mL), con y sin anticoagulante para obtener ADN y sueros, de todos los animales mediante venopunción coccígea y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Los anticuerpos se midieron cada ~2 meses (5 veces en total). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético en el Uso de Animales (CEUA-FVET- Exp. 111100-000068-15).

Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
1–9
© 2022 The Author(s)
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/10406387221085581
jvdi.sagepub.com

María L. De Brun,^{} Bruno Cosme, Marcos Petersen, Irene Alvarez,^{}
Aurea Folgueras-Flatschart, Roberto Flatschart, Carlos Javier Pani,
Rodrigo Puentes¹

Principales aportes de este experimento:

- Desarrollo de una técnica molecular de última generación para:
 - Detección temprana de la infección por BLV
 - Cuantificación absoluta del BLV
 - Determinación de bajas cargas provirales del BLV

Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
1–9
© 2022 The Author(s)
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/10406387221085581
jvdi.sagepub.com

María L. De Brun,¹ Bruno Cosme, Marcos Petersen, Irene Alvarez,¹ Aurea Folgueras-Flatschart, Roberto Flatschart, Carlos Javier Panei, Rodrigo Puentes¹

Abstract. Droplet digital PCR (ddPCR) is a highly sensitive tool developed for the detection and quantification of short-sequence variants—a tool that offers unparalleled precision enabling measurement of smaller-fold changes. We describe here the use of ddPCR for the detection of *Bovine leukemia virus* (BLV) DNA provirus. Serum samples and whole blood from experimentally infected sheep and naturally infected cattle were analyzed through ddPCR to detect the BLV *gp51* gene, and then compared with serologic and molecular tests. The ddPCR assay was significantly more accurate and sensitive than AGID, ELISA, nested PCR, and quantitative PCR. The limit of detection of ddPCR was 3.3 copies/μL, detecting positive experimentally infected sheep beginning at 6 d post-infection. The ddPCR methodology offers a promising tool for evaluating the BLV proviral load, particularly for the detection of low viral loads.

Key words: bovine leukemia virus; droplet digital PCR; enzootic bovine leukosis; proviral load.

Bovine leukemia virus (BLV; *Deltaretrovirus*) is one of the most widespread livestock pathogens in dairy herds. It is estimated that a high proportion of herds are infected with BLV in North and South America.^{3,34,42} Approximately 40% of BLV-infected cattle will develop persistent lymphocytosis within a few years of infection; <5% of infected cattle develop lymphosarcoma.^{3,13} The high prevalence of BLV infection is the result of the common occurrence of infected cattle that remain subclinical, a condition referred to as aleukemic.^{4,13} With little effort to control the spread of BLV, the virus is widely prevalent in many places.

BLV infection can impact innate and adaptive immune system cells and alter the proper functioning of uninfected cells.¹² BLV infection may also induce changes in the complex balance of cytokine expression, cell proliferation, and programmed cell death in both T- and B-lymphocytes, which is critical for immune competence and effective response to infectious challenge.¹⁰ Thus, a decreased immune response to immunization may be expected in seropositive animals. Indeed, low-magnitude serologic responses to a commercial foot-and-mouth disease vaccine³⁶ and a J5 *Escherichia coli* vaccine¹⁰ have been observed. Dairy cows infected with BLV have altered immune function associated with decreased milk production and shortened lifespan.^{2,42}

Although cattle and water buffaloes are the natural hosts of BLV, other species can be infected experimentally, with different clinical, hematologic, and immunologic manifestations. Sheep are not naturally infected with BLV,⁵² but can

become infected using blood from BLV-infected cattle, infectious BLV molecular clones, or tumor-derived cells.³⁵ Experimentally infected sheep can be used as a model to test for BLV to avoid false negatives in cattle tests. Sheep in particular exhibit interesting biological features for evaluating BLV pathogenesis as well as for diagnostic purposes. BLV-infected sheep develop tumors typical of the disease and display signs of lymphosarcoma 2.5 y after BLV infection, which is much faster than in cattle.⁷ The fetal lamb kidney (FLK) cell line persistently infected with BLV (FLK-BLV) is one of the long-term cultures used most commonly for the production of virus.³⁵

Laboratory techniques must detect subclinical infections accurately because animals infected subclinically represent 90% of BLV infections, especially those with

Instituto de Patobiología, Unidad de Microbiología, Facultad de Veterinaria—Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (De Brun, Puentes); Instituto Nacional de Metrología, Calidad y Tecnología (Inmetro), Rio de Janeiro, Brazil (Cosme, Folgueras-Flatschart, Flatschart); Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT), Buenos Aires, Argentina (Petersen, Alvarez); Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata (FCV-UNLP), La Plata, Argentina (Panei); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina (Alvarez).

¹Corresponding author: Rodrigo Puentes, Facultad de Veterinaria—Universidad de la República, Alberto Lasplacas 1550, Montevideo, 11500, Uruguay. rpuentes@fvvet.edu.uy

recent infections or with low proviral load (PVL). The World Organisation for Animal Health (OIE) recommends the use of ELISA and agar gel immunodiffusion (AGID) tests for antibody detection, and nested PCR (nPCR) for agent identification; real-time PCR (rtPCR) is also now incorporated.⁴⁹ The rtPCR has been implemented widely for clinical viral load testing, but relatively poor precision has hindered its usefulness.¹⁵

Classic BLV eradication programs rely on the correct identification and segregation or elimination of BLV-infected animals.^{41,42} However, serologic tests may fail to detect BLV-specific antibodies in recently infected animals (false negatives) or may detect maternal antibodies in calves borne to BLV-positive cows.^{9,29} To date, at least 20 countries have eradicated BLV successfully through control programs, yet BLV remains highly prevalent (up to 90%) in many regions of the world, including Eastern Europe, South America, and several Asian countries.³⁴ The primary management practices used to prevent new infections are early identification and segregation or culling of infected cattle.^{3,25} Furthermore, in certain physiologic states, such as the peripartum, the natural decrease of specific anti-BLV antibodies may produce false-negative ELISA results from day -20 to 60.³⁸ Whole blood PVLs may be a good indicator of disease progression in the field,²¹ making PVL useful for disease control programs, given that it has been shown that animals with low PVLs are less effective in viral transmission^{20,26} and that they can be kept near negative herds.

As a feasible approach to control the virus, selection of cattle carrying the *BoLA-DRB3*0902* allele has been proposed, given that this allele is strongly associated with a BLV infection profile or the low PVL phenotype.²⁰ Therefore, the inclusion of highly sensitive screening assays might increase the efficiency of an eradication program, especially for herds with low within-herd prevalence.

The precise quantification of BLV in subclinical animals in countries in which the prevalence of infection is medium or high has been suggested as a key strategy for viral control in dairy cattle.^{14,42} However, more evidence is necessary to demonstrate the effectiveness in the control of transmission from the segregation of the herd at high and low PVLs. It may be that this strategy has not been applied on a large scale because methodologies that allow viral quantification in a simple, precise, and reproducible way and in different matrices (blood or milk) have not been developed. Until recently, quantitative PCR (qPCR) was the only option, which has limitations such as the need for a reference gene, and its low efficiency in the presence of matrices with inhibitors. The inadequacy of qPCR was demonstrated in a comparison of the performance of 6 different qPCR assays, demonstrating wide discordance in the ability to detect and quantify BLV infections.¹⁹ These limitations are partially or totally resolved with droplet digital PCR (ddPCR), suggesting that ddPCR would be an excellent alternative for BLV control programs.

ddPCR is a highly sensitive tool developed for the detection and quantification of a range of microorganisms,⁴⁸ including other deltaretroviruses, such as the human T-cell lymphotropic virus (HTLV1; *Primate T-lymphotropic virus 1*).⁵¹ Digital PCR advantages include DNA quantification without the need for calibration curves, thereby allowing for exact values to be obtained easily.^{39,43} Digital PCR can measure smaller copy number variations than qPCR⁴⁷ and can determine the absolute quantification of samples with higher precision and reduced PCR bias, reducing influencing factors and making results more reliable and reproducible.^{5,33,51} Digital PCR allows small percentage differences to be detected and variants to be quantified, a significant advantage compared to existing tools (AGID, ELISA, nPCR, rtPCR) for the detection and control of BLV.

Our objective was to standardize a ddPCR or digital PCR (last-generation PCR) assay for the detection and quantification of the proviral form of BLV in subclinical animals and to compare the results with those obtained using reference techniques.

Materials and methods

Controls

As a positive control, we used DNA extracted from an FLK-BLV cell line. These cells were cultured in RPMI 1640 medium (Corning) supplemented with 5% inactivated fetal bovine serum. A gp51 glycoprotein recombinant plasmid (vector Ptop-Blunt-V2; MacroGen) was used as an additional positive control. The expected copy number was calculated according to the molecular weight of the plasmid and the DNA concentration. As a negative control, genomic DNA (gDNA) from species unrelated to the natural BLV host was used (ovine, equine, canine species); ultra-pure water was used as a no-template control (NTC) to avoid false negatives.

Experimental infection of sheep with BLV

Experimental BLV infection was carried out in a sheep model.^{8,35} Four adult female Corriedale sheep (~2-y-old) were given an IM injection of 1 mL of infection solution (10 µL of whole blood from a BLV+ naturally infected cow, in 1 mL of PBS), and 2 other sheep were used as uninfected controls kept in the same conditions. The sheep were kept on a sheep farm in southern Uruguay in a natural pasture field under typical feeding conditions, with ad libitum access to water. Blood samples (15 mL) were taken with a 19-G needle from the jugular vein of each animal into tubes with and without EDTA to obtain DNA and serum on 0, 2, 6, 9, 13, 21, 30, and 60 d post-infection (dpi). The experimental protocol was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA-FVET-Exp. 111900-000572-20).

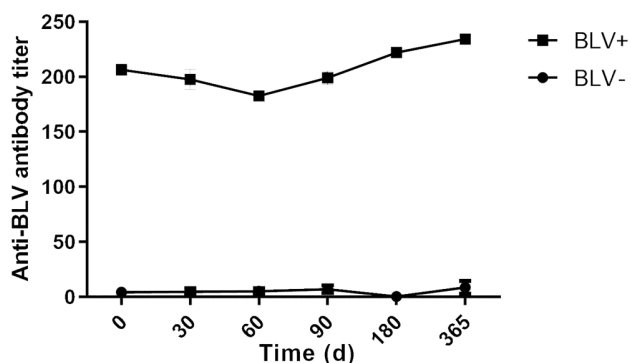


Figure 1. Bovine leukemia virus (BLV) mean antibody titer determined by ELISA for heifers >1-y-old analyzed by droplet digital PCR to determine BLV- or BLV+ status.

Cattle naturally infected with BLV

Holstein heifers ($n=34$), belonging to a cattle breeding farm in Uruguay, were analyzed for BLV antibodies every 3 mo for 12 mo by ELISA (Fig. 1) and nPCR at time 0 and 12 mo to obtain BLV-positive and -negative groups. Blood samples (10 mL), with and without anticoagulant to obtain DNA and sera, were taken from all animals by coccygeal venipuncture and stored at -20°C until processed. Antibodies were measured every ~ 2 mo (5 times in total); nPCR was performed at 0 d and at 12 mo in all animals. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA-FVET-Exp. 111100-000068-15).

Determination of anti-BLV antibodies by AGID and ELISA

AGID was performed with a commercial kit (FCV-UNLP-Argentina) following the manufacturer's instructions and the recommendations of the OIE.⁴⁹ Antigen and test sera were combined (35 μL each) and plated on 1% agarose gel plates. The precipitation bands (positive results) were visualized with indirect light 72 h post-incubation at room temperature in a humid chamber.

Anti-BLV antibodies were detected in individual sera with a blocking ELISA (P02140-10; Idexx) according to the manufacturer's instructions and the recommendations of the OIE.⁴⁹ A 2 \times dilution of 50 μL of serum was used, and results were read at an optical density of 450 nm in a microplate spectrophotometer.

DNA extraction and digestion

DNA extraction from whole blood samples was performed using a phenol-chloroform protocol.²² Isolated DNA was quantified with a UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop; Thermo Fisher) and quality evaluated on agarose gels. After extraction, the DNA was digested with *Bam*HI (Bioron) at

37°C for 15 min and the enzyme inactivated by heating at 65°C for 20 min.⁴⁴

Nested PCR

The nPCR targeted a region of 444 bp on the *env* BLV gene (the gp51 coding gene). Two rounds of amplification used the following primers: F1: 5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCA GATA-3'; R1: 5'-AACAACAACCTCTGGGAA-3'; F2: 5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3'; R2: 5'-GCGAG GCCGGTCCAGAGCTGG-3'. The 25- μL reactions contained 12.5 μL of 2 \times MangoMix (Bioline), 1 μL (10 μM) of each primer, and 50 ng of DNA template. The result of the amplification was visualized in 1.5% agarose gels in TAE 1 \times buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.3), stained with GoodView nucleic acid stain (SBS Genetech).^{11,34}

Real-time PCR

BLV proviral DNA quantification was performed using a SYBR green fluorescence assay (7500 real time PCR system; Applied Biosystems). The qPCR was performed following a modified protocol,^{32,40} using the following primers: F: 5'-CCTCAATTCCTTTAAACTA-3' and R: 5'-GTACC GGGAAGACTGGATTA-3'. The sensitivity of these BLV SYBR qPCR assays was described as 2 copies per reaction.³² The reaction was performed in a volume of 25 μL containing 12.5 μL of 2 \times Fast start SYBR green kit (Roche), 1 μL (10 μM) of each primer, and 100 ng of DNA template. The thermocycler profile included a pre-denaturation of 2 min at 50°C , then denaturation for 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C , 15 s at 55°C , and a final extension of 60 s at 60°C . The plasmid pBLV1 containing the BLV *pol* gene was used as a standard. Ten-fold dilutions of this standard were made: 5×10^6 to 5×10^0 copies/ μL . Positive results were classified in high and low PVLs, with a cutoff of 2,000 copies/ μg of DNA.¹⁴

Primer and probe design for ddPCR

The primers and probe were designed using Primer3web v.4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>),^{23,24,46} physicochemical parameters were calculated by NetPrime (PREMIER Biosoft International; <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), and specificity and spurious pairing were determined with NCBI Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).⁵⁰

No artifacts were observed on the qPCR SYBR green melting curve. Artifacts were investigated using 2 experiments in rtPCR, the first without DNA, varying the concentration of the forward and reverse primers in the final concentrations of 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.062 mM, and 0.031 mM (Table 1). The second experiment used concentrations of 0.35 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1.25 mM, and

Table 1. Experimental design for primer concentration optimization measured as cycle threshold.

Reverse primer (mM)	Forward primer (mM)				
	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031
0.5	31.0	31.9	31.9	36.4	38.7
0.25	31.5	33.0	31.2	34.8	37.0
0.125	32.5	34.2	33.2	37.1	UD
0.062	34.4	35.9	35.3	UD	UD
0.031M	37.0	37.0	37.2	UD	UD

UD=undetermined.

DNA from 39 samples to determine the influence of target DNA on the formation of artifacts.

Droplet digital PCR for BLV quantification

ddPCR was performed (QX200 droplet digital PCR system; Bio-Rad) per the manufacturer's protocol. The probe and primer sequences were designed to amplify a partial segment of the BLV *env* gene. The primer sequences were F: 5'-CAGTGACTGGGTTCCCTCTGTC-3' and R: 5'-AGG GCGAGRCCGGGTCAGAG-3'; the probe was HEX-5'-CCCTCCCTGGGCTCCCGARA-3'-BHQ1. Briefly, in a typical 20- μ L assay, 1 μ L of DNA sample was mixed with 1 μ L of each primer (10 μ M), 0.5 μ L of probe (10 μ M), and 2 \times Supermix emulsified with oil (Bio-Rad); the droplets were transferred to a 96-well plate (Eppendorf). The PCR assay was performed in a thermocycler (C1000 touch cycler; Bio-Rad) with the following parameters: initial denaturation of 10 min at 95°C, then 40 cycles of 30 s at 94°C, and 10 min at 58°C, with final deactivation of the enzyme for 10 min at 98°C. The presence of fluorescent droplets determined the number of resulting positive events that were analyzed in the software (QuantaSoft v.1.7.4; Bio-Rad), using dot charts. The BLV PVL was determined as copies/ μ L of bovine gDNA. Each sample was run in duplicate, and results were averaged.

Sensitivity and specificity of ddPCR

In order to initially evaluate the sensitivity (how well the test could identify true positives) and specificity (how well the test could identify true negatives) of this proposed ddPCR method, we analyzed a cell line persistently infected with BLV (FLK) and a recombinant plasmid containing BLV as positive samples. We also tested the ability of the technique to detect the virus both in highly pure samples (plasmids) and in samples of cells infected with the virus.^{30,31} In addition, DNA from complete genomes of unrelated animal species was used as negative control.

To gauge the accuracy of ddPCR as a qualitative method, the results of a set of samples were compared with other standard technics. BLV-infected sheep were defined as true positives; uninfected sheep were used as true negatives. Serum

and DNA samples from both groups (uninfected and infected animals) were analyzed by AGID, ELISA, nPCR, and ddPCR. Sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) were calculated (v.9.0.1.1; MedCalc). We also compared results of herd samples obtained by qPCR and ddPCR; mean copy number and the Pearson correlation coefficient for time were calculated.

The digested DNA was compared to undigested DNA using ddPCR with sample dilutions of 1:10, 1:100, 1:1,000, and 1:10,000 of single samples (F3542) in a one-step reaction with 15 min of digestion by *Bam*HI.

Validation of quantitative ddPCR method

Five 10-fold dilutions of the linearized recombinant plasmid containing the *gp51* sequence (vector Ptop-Blunt-V2), in triplicate, and 2 NTC were quantified by ddPCR to validate the quantitative method according to ISO/IEC 17025:2017 (<https://www.iso.org/standard/66912.html>). Linear regression was used to estimate an analytical curve characterized by the slope (analytical sensitivity), intercept, and confirmed by R^2 . Assuming confidence of 95%, the standard error at the intercept (SE) permitted calculation of the limit of detection ($LOD=3.3 \times [SD \text{ of intercept/slope}]$) and limit of quantification ($LOQ=10[SD \text{ of intercept/slope}]$). For selectivity analysis, DNA extracted from blood from ovine, equine, and canine species and from uninfected bovine or ovine sera were tested. Other selective analysis of the primers designed for ddPCR was performed in silico using Primer-BLAST (consulting non-redundant [nr] databank).

Results

Primer and probe design

The primers and probe were designed to amplify a small region of the BLV *env* gene *gp51*. Three sets of primers and probes were generated, and the set with the best physico-chemical parameters was chosen. For this set, with a 162-bp amplicon size, the self-dimer ΔG was -2.84 Kcal/mol and -6.91 Kcal/mol for the forward and reverse primers, respectively, and the cross dimer ΔG was -5.35 Kcal/mol. The melting temperature (T_m) was at least 60°C for each primer

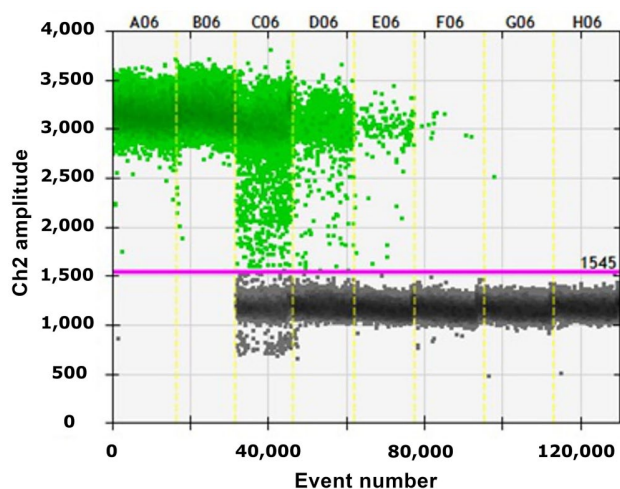


Figure 2. Output from droplet digital PCR of plasmid dilutions containing the bovine leukemia virus gene *gp51* from $0.02 \text{ ng}/\mu\text{L}$ to $0.02 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (A06–G06) and NTC (H06). Gray=negative events; green=positive events.

and 70°C for the probe. The theoretical T_m was tested empirically, indicating that 60°C was the ideal temperature. Our search on Primer-BLAST returned 8,670 hits; a maximum of 2 variable loci were detected in the primer, which was compensated for by incorporation of degenerate primers with satisfactory hybridization to both primers and probe.

Empirical tests showed that qPCR with $0.1\text{--}0.5 \text{ mM}$ primers, in the absence of DNA template, generated nonspecific amplification ($C_t=32$ and 30.9 , respectively). However, in the presence of target DNA or nonspecific DNA template, this amplification disappeared. The reactions carried out with the probe did not show nonspecific amplification.

Standardization and validation of quantitative ddPCR

The assay performed well on the ddPCR platform, showing a LOD in the scatterplots of event number (droplets) versus fluorescence amplitude (Fig. 2). The QuantaSoft software provides autoanalysis as well as manual thresholding tools that allow correct designation of positive and negative droplet populations. Positive drops were determined by fluorescence intensity using QuantaSoft software. Only drops that exceeded the threshold value were counted as positive. The linear regression of 17 points (5 plasmid dilutions in triplicate and 2 NTC) generated an analytical curve with linear correlation $R^2=0.9952$, sensitivity (slope) of 17,780, and intercept of -0.2306 . Assuming a 95% confidence level, we could calculate a LOD of 3 copies/ μL of reaction volume and a LOQ of 11 copies/ μL of reaction volume. We used $1 \mu\text{L}$ in a typical reaction. In a qualitative analysis, animals with a ddPCR result of ≥ 3 copies/ μL of reaction were considered positive.

The selectivity analysis for ddPCR showed no amplification when whole blood gDNA from a sheep, a horse, and a dog, and BLV-uninfected sheep were tested. The in-silico analysis of the primers with Primer-BLAST found similarities only to BLV (909 of 932 matches) in queries made to nr databank, considering virus (taxid: 10239) or retrovirus (taxid: 11632) subsets, respectively.

Sheep infected experimentally with BLV

From 13 dpi, the 4 BLV-inoculated sheep were positive by nPCR. Specific antibodies were detected on day 28 in all infected sheep (4 of 4) by AGID and ELISA. Uninfected sheep remained negative by nPCR and serologic tests throughout the experiment (Table 2). On the other hand, ddPCR detected BLV from 2 dpi in 3 of 4 BLV-positive sheep and at 6 dpi in all animals. Control sheep remained negative throughout the study by ddPCR (Table 2; Fig. 3).

Cattle infected naturally with BLV

Of the 34 animals analyzed, 20 were positive (BLV+) and 14 remained negative (BLV-) for 12 mo by ELISA and nPCR. The samples from both groups were analyzed by qPCR and ddPCR. Of the animals determined to be negative by ELISA and nPCR, 100% were negative by qPCR, whereas 35% were positive by ddPCR (Table 3). The ddPCR-positive samples were sent for sequencing, and the presence of the BLV *gp51* gene was confirmed (data not shown). Of the positive samples that were analyzed twice (0 and 365 d), the mean PVL measured by qPCR at time 0 was 8,266 copies/ μg DNA, and at 365 d was 16,510 copies/ μg DNA. For ddPCR, the count at time 0 was 29,325 copies/ μg DNA, and at 365 d was 26,611 copies/ μg DNA (Fig. 4). When classified by viral load (high and low load), the tests coincided in 50% of the samples.

Sensitivity specificity

The proposed ddPCR method was able to detect BLV in the FLK cell line and recombinant plasmid. Otherwise, no amplification was obtained from uninfected animal gDNA. The provirus was not detected in the control sheep (not experimentally infected) over the test period, demonstrating 100% specificity of the ddPCR in true-negative samples. The ddPCR was able to detect BLV from 2 dpi, whereas nPCR positive detection was at 13 dpi (Tables 2 and 4). The possibility that these were false-positive results was ruled out by sequencing digital PCR products and confirming 100% similarity with the BLV *gp51* gene deposited at GenBank using BLAST (data not shown).

Digestion of gDNA could potentially increase the sensitivity of detection of BLV in positive samples. The results analysis found 40% more copies/ μL in the digested sample

Table 2. Sheep experimentally infected with bovine leukemia virus ($n=4$) and controls ($n=2$) detected by agar gel immunodiffusion (AGID), ELISA, nested PCR (nPCR), and droplet digital PCR (ddPCR) until day 60.

	Infected sheep (no. of positive samples)								Control sheep (day 60)
	Day 1	Day 2	Day 6	Day 9	Day 13	Day 21	Day 28	Day 60	
AGID	0	0	0	0	0	0	4	4	0
ELISA	0	0	0	0	0	0	4	4	0
nPCR	0	0	0	0	4	4	4	4	0
ddPCR	0	3	4	4	4	4	4	4	0

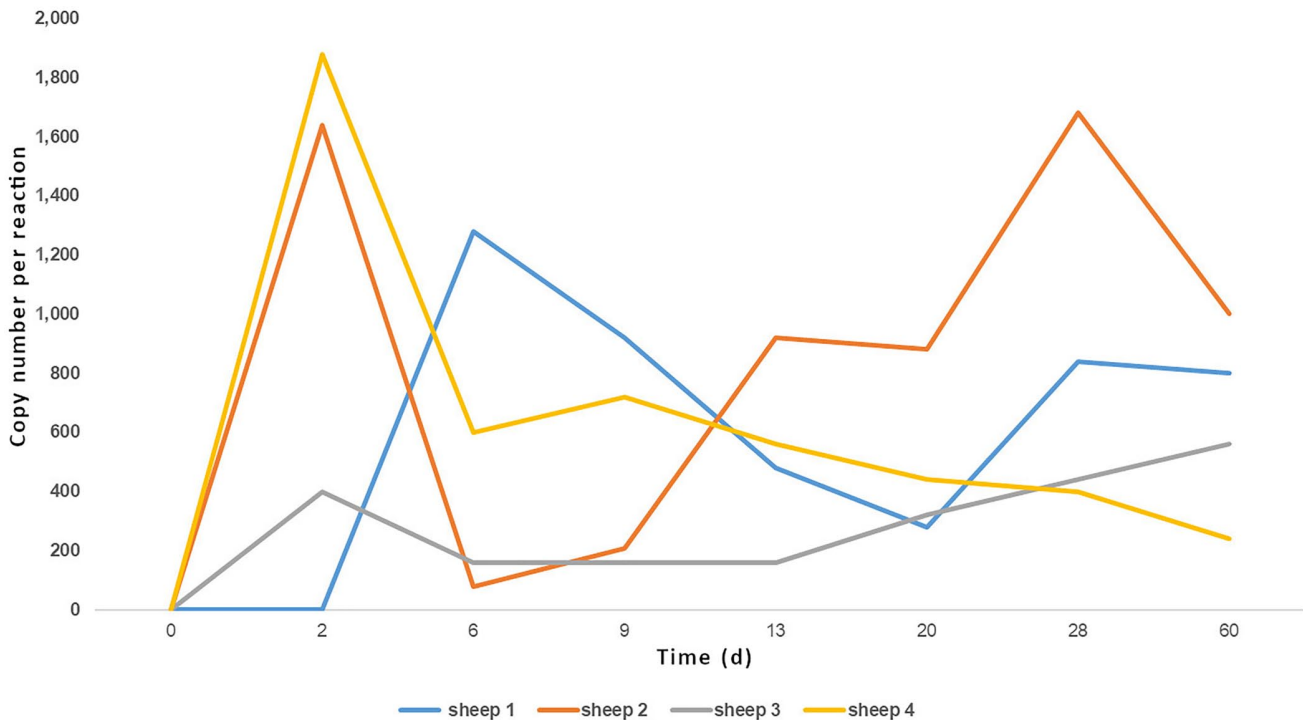


Figure 3. Number of copies of *gp51* from bovine leukemia virus-infected sheep quantified by droplet digital PCR.

than the nondigested sample, but results were irregular at 1:1,000 and 1:10,000.

Discussion

Quantification of PVL using ddPCR has been established for human retroviruses, wherein the PVL in HTLV1 infections was used as a marker of disease progression.⁴⁵ Based on the similarities in pathogenesis between HTLV and BLV, we optimized ddPCR for BLV in peripheral blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. The resulting ddPCR was highly sensitive and specific for BLV from various infected animals, making it suitable for use in early detection, to clarify inconclusive samples analyzed by qPCR, as well as for PVL quantification. Droplet digital PCR has not been optimized previously for a provirus of animal origin, to our knowledge, and this technique could be applied to other viruses of veterinary interest.

The primary challenge of the ddPCR approach is avoiding accidental subquantification of the proviral gene, which can be avoided through the complete digestion of the host genome with restriction enzymes, with the caveat that the digest does not affect the provirus assay. With this precaution, we found ~40% more copies of BLV after digesting the samples. Although this strategy significantly increases the sensitivity of the test,^{1,16} there may still be droplets with more than one viral target.

Our ddPCR assay was able to detect positive sheep from 2 dpi, whereas nPCR, the OIE reference method, detected positive sheep from 13 dpi. Although not a replacement for nPCR, the greater sensitivity of ddPCR has an advantage for the detection of BLV in the earliest days of infection, when the proviral load is very low. We did not compare the sensitivity of ddPCR to qPCR; however, it would be expected that the sensitivity of qPCR is similar to that of nPCR.^{19,32}

Table 3. Molecular detection of bovine leukemia virus in ELISA-negative heifers after 1-y observation in an infected herd. Results of real-time PCR (rtPCR) and droplet digital PCR (ddPCR) in copies/ μ L.

ID	rtPCR		ddPCR	
	No. of viral copies	Qualitative result	No. of viral copies	Qualitative result
1	0	–	0	–
2	0	–	7.6	+
3	0	–	4.8	+
4	0	–	0	–
5	0	–	0	–
6	0	–	4.0	+
7	0	–	0	–
8	0	–	0	–
9	0	–	0	–
10	0	–	4.0	+
11	0	–	0	–
12	0	–	6.8	+
13	0	–	0	–
14	0	–	0	–

–=negative; +=positive.

Using control sheep not experimentally infected, the provirus was not detected over the test period in these animals, demonstrating 100% specificity of the ddPCR in true-negative samples. The use of DNA from cattle (the natural host of BLV) as truly negative samples is not feasible given that the prevalence of BLV in dairy cattle in Uruguay is 80–90%, increasing the possibility of false negatives. We analyzed samples from 14 heifers that were seronegative for BLV by ELISA during 1 y, and 5 tested positive for BLV by digital PCR. To confirm that these were true positives and rule out the possibility of cross-contamination in the DNA samples, these 5 animals were tested in duplicate, and results were confirmed by sequencing (data not shown). The LOD of this technique is 3 copies/ μ L, an improvement compared to 5 copies/ μ L detectable by qPCR of blood samples,³² which may explain the 5 new positive samples. It may be that these animals carried an undetectable permanently low PVL. Based on these results, we recommend the cautious use of samples from negative cattle diagnosed by the currently available tests, when comparing detection tools or immune responses to BLV.

In addition to nucleic acid detection, ddPCR is a platform designed to provide high precision for quantification of target molecules because it carries out direct quantification without requiring a calibration curve.^{17,45} In contrast, the rtPCR assays used widely in diagnostic laboratories around the world show significant variability in the measurement of the BLV proviral DNA copy number among laboratories, even when qPCR is performed by experienced staff.^{28,32,40} We found that PVLs were not concordant between qPCR and ddPCR. In general terms, ddPCR detected a significantly

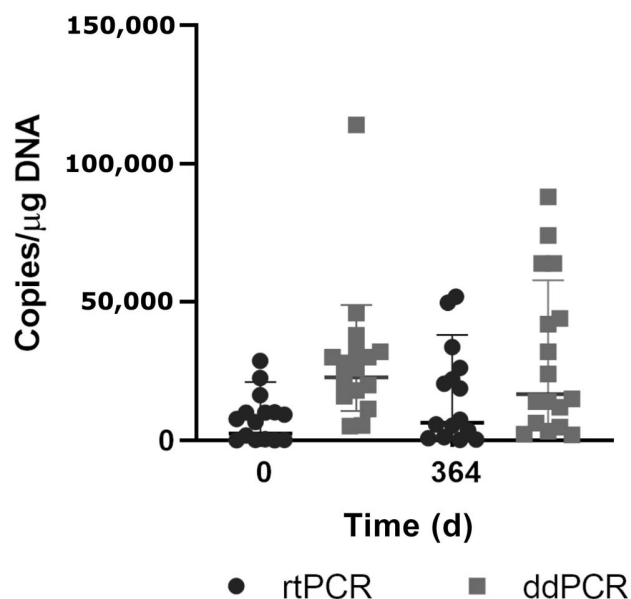


Figure 4. Quantification of bovine leukemia virus (BLV) proviral load by droplet digital PCR (ddPCR) and real-time PCR (rtPCR) of BLV-positive Holstein heifers over 1 y. Central bar=mean; whiskers=1SD.

higher number of virus copies than qPCR, which can be explained by the higher sensitivity and resistance to inhibitors of ddPCR.^{17,27,37} This can be an important advantage in BLV control if we intend to use easily accessible samples such as milk (bulk tank or individual), but that have significantly less provirus and more PCR inhibitors than blood samples. Other authors have shown that the ddPCR assay

Table 4. Sensitivity and specificity of tests for detection of infection of sheep with bovine leukemia virus: agar gel immunodiffusion (AGID), ELISA, nested PCR (nPCR), and droplet digital PCR (ddPCR).

	Sensitivity (%)	95% CI (%)	Specificity (%)
AGID	25.0	11.5–43.4	100
ELISA	25.0	11.5–43.4	100
nPCR	50.0	31.9–68.1	100
ddPCR	84.4	67.2–94.7	100

was more tolerant to sodium dodecyl sulfate and heparin than the qPCR assay. This phenomenon is a result of reaction partitioning; the occurrence of individual reactions in each droplet diminishes the impact of inhibitors on PCR amplification by retaining the positive signal even when moderate PCR inhibition occurs in a droplet.⁶ Resistance to PCR inhibitors is a crucial advantage for future development of ddPCR in milk samples for BLV control.

We detected antibodies by ELISA and AGID ~1 mo post-infection in sheep and 15 d after positive nPCR detection. Similar findings have been described after the experimental infection of steers, but proviral DNA was detected via rtPCR at 24 dpi (almost 10 d after the ddPCR) and antibodies by ELISA at 36 dpi.¹⁸ When we analyzed samples from cattle, we found animals with low PVLs by ddPCR that were seronegative by ELISA during all tests (12 mo). This is likely because, with a low amount of circulating virus, the immune response is limited, and antibody titers are not detected by conventional tools.

The high resistance to inhibitors, independence from the need for standard curves, and inter- and intra-laboratory reproducibility of ddPCR make the method attractive. The correlation with qPCR in determining PVL was not conclusive and should be reviewed in future research.

Acknowledgments

We thank the staff of ‘Campo de Recría La Cruz’ (Florida, Uruguay) for supporting field activities, and veterinarians Drs. Gustavo Sacco and Agustin Furtado. We also thank Dr. Scott Brandl for his constructive suggestions and English editing, and Dr. Martín Breijo for the follow-up in the writing of the manuscript.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed the receipt of the following financial support for research, authorship and/or publication of this article: Our project was funded by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FSSA_X_2014_1_105283-ANII).

ORCID iDs

María L. De Brun  <https://orcid.org/0000-0002-3331-9566>
Irene Alvarez  <https://orcid.org/0000-0001-5194-670X>

References

- Anderson EM, Maldarelli F. Quantification of HIV DNA using droplet digital PCR techniques. *Curr Protoc Microbiol* 2018;51:e62.
- Bartlett PC, et al. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 2013;96:1591–1597.
- Bartlett PC, et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2014;244:914–922.
- Blagitz MG, et al. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res Vet Sci* 2017;114:109–116.
- Devonshire AS, et al. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2016;16:366.
- Dingle TC, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem* 2013;59:1670–1672.
- Djilali S, Parodi AL. The BLV-induced leukemia–lymphosarcoma complex in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;22:233–244.
- Durkin K, et al. Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology* 2016;13:33.
- Eaves FW, et al. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 1994;39:313–321.
- Erskine RJ, et al. Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 *Escherichia coli* bacterin. *Vet Med Int* 2011;2011:915747.
- Fechner H, et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996;43:621–630.
- Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;163:103–114.
- Gillet N, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007;4:18.
- Gutiérrez G, et al. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 2011;151:255–263.
- Hayden RT, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 2013;51:540–546.
- Huggett JF, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem* 2013;59:892–902.
- Huggett JF, et al. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 2015;61:79–88.

18. Hutchinson HC, et al. Bovine leukemia virus detection and dynamics following experimental inoculation. *Res Vet Sci* 2020;133:269–275.
19. Jaworski JP, et al. Interlaboratory comparison of six real-time PCR assays for detection of bovine leukemia virus proviral DNA. *J Clin Microbiol* 2018;56:e00304-18.
20. Juliarena MA, et al. Hot topic: bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci* 2016;99:4586–4589.
21. Kobayashi T, et al. Increasing bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leukosis: a prospective study in Japan. *Prev Vet Med* 2020;178:104680.
22. Köchl S, et al. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol–chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol* 2005;297:13–30.
23. Köressaar T, et al. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 2018;34:1937–1938.
24. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007;23:1289–1291.
25. Kuczewski A, et al. Economic evaluation of 4 bovine leukemia virus control strategies for Alberta dairy farms. *J Dairy Sci* 2019;102:2578–2592.
26. Kuczewski A, et al. Invited review: bovine leukemia virus—transmission, control, and eradication. *J Dairy Sci* 2021;104:6358–6375.
27. Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2017;55:1621–1628.
28. Lew AE, et al. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5′ Taq nuclease PCR using a 3′ minor groove binder fluorogenic probe. *J Virol Methods* 2004;115:167–175.
29. Maresca C, et al. Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005–2012). *Prev Vet Med* 2015;119:222–226.
30. Moratorio G, et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol* 2010;155:481–489.
31. Panei CJ, et al. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leukosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet Res* 2013;9:95.
32. Petersen MI, et al. Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 2018;101:6366–6374.
33. Pinheiro-de-Oliveira TF, et al. Development of a droplet digital RT-PCR for the quantification of foot-and-mouth virus RNA. *J Virol Methods* 2018;259:129–134.
34. Polat M, et al. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J* 2017;14:209.
35. Porta NG, et al. Experimental infection of sheep with bovine leukemia virus (BLV): minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies. *Rev Argent Microbiol* 2019;51:316–323.
36. Puentes R, et al. Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res* 2016;12:119.
37. Quan P-L, et al. DPCR: a technology review. *Sensors (Basel)* 2018;18:1271.
38. Rama G, et al. Análisis del descenso de anticuerpos en el parto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzootica Bovina [Analysis of the decrease in antibodies in the peripartum and its impact on the serological diagnosis of enzootic bovine leukosis]. *Veterinaria (Montev)* 2012;48:11–17. Spanish. <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/195>
39. Ramírez JD, et al. Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0007063.
40. Rola-Luszczak M, et al. Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods* 2013;189:258–264.
41. Ruggiero VJ, Bartlett PC. Control of bovine leukemia virus in three US dairy herds by culling ELISA-positive cows. *Vet Med Int* 2019;2019:3202184.
42. Ruggiero VJ, et al. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J Dairy Sci* 2019;102:9165–9175.
43. Rutsaert S, et al. Digital PCR as a tool to measure HIV persistence. *Retrovirology* 2018;15:16.
44. Shi X-M, et al. Ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for the detection of HTLV-1 DNA: a cascade signal amplification strategy integrating λ -exonuclease aided target recycling with hybridization chain reaction and enzyme catalysis. *Biosens Bioelectron* 2018;109:190–196.
45. Thulin Hedberg S, et al. Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2. *J Virol Methods* 2018;260:70–74.
46. Untergasser A, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
47. Whale AS, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e82.
48. White RA 3rd, et al. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J Virol Methods* 2012;179:45–50.
49. World Organisation for Animal health (OIE). Enzootic bovine leukosis. Chapter 3.4.9. In: *OIE Terrestrial Manual 2018*. https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf
50. Ye J, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012;13:134.
51. Yurick D, et al. Multiplex droplet digital PCR assay for quantification of human T-cell leukemia virus type 1 subtype c DNA proviral load and T cells from blood and respiratory exudates sampled in a remote setting. *J Clin Microbiol* 2019;57:e01063-18.
52. Zyrianova IM, Kovalchuk SN. Bovine leukemia virus *tax* gene/Tax protein polymorphism and its relation to enzootic bovine leukosis. *Virulence* 2020;11:80–87.

4.2 Experimento número 2:

“Determinar la presencia de BoHV-4 en rodeos del Uruguay. (Artículo científico N° II)”

Animales y toma de muestras

- A) Se utilizaron 550 sueros bovinos del banco de sueros de la Unidad de Microbiología de Facultad de Veterinaria de UdelaR. Las muestras fueron extraídas por venopunción coccígea y recolectadas en tubos sin anticoagulantes en el año 2009. Las mismas correspondían a ganado Holando múltiparo, clínicamente sano, perteneciente a 41 productores de los Departamentos de Florida (4/41), Durazno (27/41) y Tacuarembó (11/41).
- B) Con la finalidad de la determinación del genoma viral del BoHV-4, se extrajeron muestras de sangre de 47 vacas de un tambo del departamento de Florida con 400 vacas en ordeño y con antecedentes de metritis posparto. Las muestras, fueron extraídas mediante venopunción coccígea y recolectadas en tubos con y sin anticoagulantes en el año 2016.

Artículo original

Detección de herpesvirus bovino 4 (BoHV-4) en rodeos lecheros de Uruguay

Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) in dairy herds in Uruguay

Laureana De Brun ^{1*} 0000-0002-3331-9566 Valeria da Silva ² 0000-0002-8990-9100 Cecilia Castro ¹ 0000-0002-4026-1171 Lucía Rivero ² 0000-0002-9716-4364	Marcos Mionetto ¹ 0000-0002-6999-2031 Federico Rodríguez ¹ 0000-0002-4076-289X Fabrício Campos ³ 0000-0002-5948-472X Rodrigo Puentes ⁴ 0000-0002-4618-9721
---	---

¹ Área de Bacteriología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Las Placetas 1550, Montevideo, Uruguay. *Email: laureanadebrun@gmail.com

² Área de Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

³ Laboratório de Bioinformática e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, Brasil.

⁴ Área de Virología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 56 N° 213 (2020 Ene - Jun) e20205621303	DOI: 10.29155/VET.56.213.3 	Recibido: 26/12/2018 Aceptado: 12/12/2019
---	---	--

Principales aportes de este trabajo:

- Estandarización de una técnica molecular (nPCR) para el diagnóstico de BoHV-4 puesta al servicio del Laboratorio de Diagnóstico de la unidad de Microbiología.
- Primer diagnóstico en Uruguay de la detección de gamma herpesvirus tipo 4 (BoHV-4) en rodeos sanos y con antecedentes de problemas reproductivos

Detección de herpesvirus bovino 4 (BoHV-4) en rodeos lecheros de Uruguay

Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) in dairy herds in Uruguay

Laureana De Brun^{1*} 0000-0002-3331-9566

Valeria da Silva² 0000-0002-8990-9100

Cecilia Castro¹ 0000-0002-4026-1171

Lucía Rivero² 0000-0002-9716-4364

Marcos Mionetto¹ 0000-0002-6999-2031

Federico Rodríguez¹ 0000-0002-4076-289X

Fabrizio Campos³ 0000-0002-5948-472X

Rodrigo Puentes⁴ 0000-0002-4618-9721

¹ Área de Bacteriología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Las Placetas 1550, Montevideo, Uruguay. *Email: laureanadebrun@gmail.com

² Área de Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

³ Laboratório de Bioinformática e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, Brasil.

⁴ Área de Virología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 56
Nº 213 (2020 Ene - Jun) e20205621303

DOI: 10.29155/VET.56.213.3

Recibido: 26/12/2018

Aceptado: 12/12/2019

Resumen

El herpesvirus bovino 4 (BoHV-4) es un gammaherpesvirus distribuido mundialmente. Se ha aislado tanto de animales sanos como enfermos con afecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos y endometritis. Realiza infección latente en células monocíticas y del sistema nervioso periférico y/o central. La baja eficiencia reproductiva es un problema identificado en la ganadería uruguaya. Los agentes virales con impacto reproductivo identificados en el país incluyen el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (herpesvirus bovino 1, BoHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Teniendo en cuenta que países de la región han puesto en evidencia la presencia de BoHV-4 y la posible relación de este virus con problemas reproductivos, el objetivo de este estudio fue explorar la presencia de BoHV-4 en rodeos de bovinos lecheros de Uruguay. Se utilizó ELISA comercial para detectar anticuerpos específicos contra BoHV-1, BoHV-4 y BVDV y PCR para confirmar la presencia de ADN de BoHV-4, realizando posteriormente la secuenciación genética. Se utilizaron 597 muestras de suero de vacas Holando de los departamentos de Florida, Durazno y Tacuarembó. Del total, 195 (32,7%) tuvieron anticuerpos para BoHV-4, 285 (47,7%) para BoHV-1 y 564 (94,4%) para BVDV. Se detectó el ADN de BoHV-4 en 13/17 muestras. El alineamiento del árbol filogenético demostró un alto nivel de identidad (97,2%) entre las cepas uruguayas y de otros países. Esta representa la primera comunicación de la detección de BoHV-4 en Uruguay. Estudios futuros deben evaluar la diseminación del virus en la población bovina y su eventual impacto en la salud y producción ganadera nacional.

Palabras claves: Gammaherpesvirus, PCR, Ruminantes, Serología.

Abstract

Bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) is a gammaherpesvirus worldwide distributed. It has been isolated in healthy and unhealthy animals with respiratory infections, vulvovaginitis, mastitis, abortions and endometritis. The persistent infection of BoHV-4 happens in monocytic cells and tissues that are part of peripheral and/or central nervous system. The reduced reproductive efficiency and the low index of procreation are the main problems in the Uruguayan breeding cattle. Reproductive tract infections include two main viruses identified in the country, infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus (bovine herpesvirus type 1, BoHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV). In some countries of the region have been evidenced the presence of BoHV-4 and your possible relationship with reproductive problems. Thus, the main aim of this study is to detect the presence of BoHV-4 in Uruguayan dairy herds. Commercial ELISA were used to detected BoHV-4, BoHV-1 and BVDV antibodies. PCR was used to detect the presence of BoHV-4 DNA and the products were confirmed by Sanger sequencing. Were used 597 samples of Holstein cattle from Florida, Durazno and Tacuarembó provinces. A total of 195 (32.7%) were positive to BoHV-4, 285 (47.7%) to BoHV-1 and 564 (94.4%) to BVDV antibodies. To BoHV-4 DNA, 13 of 17 samples were positives. The alignment to phylogenetic analysis showed a high degree of similarity (97.2%) among Uruguayan and worldwide strains. This is the first diagnosis of the presence of BoHV-4 in Uruguay. Future studies must evaluate the dissemination of the virus in the bovine population and the likely impact it has in the dairy healthy and national milk production.

Keywords: Gammaherpesvirus, PCR, Ruminants, Serology.

Introducción

El herpesvirus bovino 4 (BoHV-4), también llamado gammaherpesvirus bovino 4, pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammaherpesviridae*, género *Rhadinovirus* (ICTV, 2018), y ha sido detectado en bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis e incluso en animales aparentemente sanos (Morán et al., 2015). Se asocia mayoritariamente a infecciones del tracto reproductivo de los bovinos, particularmente durante el periodo posparto (Chastant-Maillard, 2013). Estudios epidemiológicos indican que la seroprevalencia de BoHV-4 es significativamente mayor en hembras que abortan y en hembras que manifiestan repetición de celos, que en aquellas que no presentan estos signos (Kale et al., 2011; Motta et al., 2013), sugiriendo que la exposición al agente podría tener un impacto negativo en la eficiencia reproductiva. BoHV-4 se ha detectado en tejidos de fetos bovinos abortados esporádicamente (Delooz et al., 2017). Existen estudios que asocian el BoHV-4 con infertilidad en hembras o el desarrollo de enfermedades en el tracto reproductivo en el posparto, ya sea solo o en coinfección con otros patógenos (Monge et al., 2006; Welchman et al., 2012; Areda et al., 2018).

BoHV-4 puede transmitirse por vía horizontal y vertical. La primera ocurre por contacto directo e indirecto mediante secreciones y fómites. Las secreciones nasales, orales o genitales representan fuentes de infección para otros animales. La multiplicación primaria del BoHV-4 se lleva a cabo dentro de las células epiteliales de las mucosas nasales, orales y genitales, luego el virus se disemina dentro del organismo en macrófagos y linfocitos. Durante la fase aguda de la infección el virus se replica en los linfocitos, ocurriendo la multiplicación masiva 7-8 semanas postinfección. Como otros herpesvirus, el BoHV-4 presenta capacidad para establecer latencia, siendo las células de la línea linfoide el principal sitio de latencia para los gammaherpesvirus, pudiendo además alojarse en los ganglios de los nervios trigéminos (Campos et al., 2014). Los hospedadores latentemente infectados son fuentes potenciales de transmisión viral para el rebaño y pueden excretar el virus ante condiciones de estrés, infecciones intercurrentes, el transporte o la administración de glucocorticoides (Morán et al., 2015).

En países de Sudamérica, el virus ha sido detectado desde hace varios años. En Argentina se detectó por primera vez en 2007 en mucus cérvico-vaginal de vacas que abortaron (Verna et al., 2008), y desde entonces el número de animales infectados detectados ha ido en aumento, existiendo actualmente más de 40 aislamientos de BoHV-4 en este país (Morán et al., 2015). En Brasil, Costa et al. (2011), en el estado de Minas Gerais reportaron casos de BoHV-4 en terneros con signos neurológicos, en siete de diez de las regiones de dicho estado, lo que sugiere que el virus está extendido en la zona. Otros autores, en el estado de Paraná aislaron BoHV-4 en una de cuatro muestras de hisopado de descargas vaginales extraídas de hembras con antecedentes de aborto (Krüger et al., 2015a) y luego mediante la prueba

serológica de ELISA, Krüger et al. (2015b) determinaron que había exposición a BoHV-4 en bovinos de 315 establecimientos de los 13 estados de Brasil que analizaron.

En Uruguay, se estima que las pérdidas reproductivas representan aproximadamente 11 al 12% y los índices de procreo rondan el 70% (Uruguay XXI, 2015). Estos han sido identificados como problemas relevantes en la ganadería de cría a nivel nacional, y a pesar de que pueden deberse a una multiplicidad de causas, los agentes infecciosos con conocido o potencial efecto sobre la reproducción, y en particular los agentes virales, no han sido exhaustivamente explorados. En cuanto a las virosis involucradas en fallas reproductivas diagnosticadas en Uruguay, están el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBRV o herpesvirus bovino 1 -BoHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) (Easton, 2006), ambos ampliamente difundidos en los rodeos lecheros nacionales y recientemente se encontró como abortivo en bovinos al virus de parainfluenza 3 (Macias-Rioseco et al., 2019). El BoHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Puede producir infecciones latentes en los ganglios trigéminos, lo cual tiene importancia epizootológica dado el peligro que representan en la transmisión los animales asintomáticos y serológicamente negativos (Jones et al., 2006). Se han descrito para BoHV-1 una amplia variedad de signos clínicos como consecuencia de su acción sobre los sistemas respiratorio, genital, digestivo y nervioso. El BVDV perteneciente al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos y de inmunosupresión los de mayor impacto económico (Bielefeldt, 1995). Maya et al., 2016 publicaron la primera caracterización genética del BVDV en Uruguay en predios con problemas reproductivos, demostrando que las especies BVDV-1 y -2 circulan en rodeos nacionales, observando supremacía del subtipo BVDV-1a.

La vacunación contra BoHV-1 y BVDV en el país no es obligatoria, pero se realiza desde hace varias décadas. Sin embargo, ambos agentes siguen teniendo una alta seroprevalencia, estimadas en aproximadamente 36% y 77% para BoHV-1 y BVDV respectivamente a nivel individual, y de 99% para BoHV-1 y 100% para BVDV a nivel de establecimientos, lo que sugiere una alta difusión de ambos agentes, dado a la poca implementación de la vacunación en el País en esa época los resultados positivos se atribuyen a anticuerpos generados debido a la exposición natural al virus BoHV-1 y BVDV (Repiso et al., 2005; Guarino et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la presencia de BoHV-4 en Uruguay ni su posible impacto en la salud animal. Debido a los diferentes cuadros con los que se ha asociado a este virus, la complejidad del diagnóstico y el interés creciente de investigaciones en las enfermedades reproductivas presentes en el país, es que el propósito de este estudio fue explorar la presencia de BoHV-4 en rodeos lecheros en Uruguay.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron un total de 597 sueros bovinos sin antecedentes de vacunación para enfermedades reproductivas, pertenecientes a 42 productores lecheros, distribuidos en dos experimentos que se detallan a continuación.

Experimento 1

Se utilizaron 550 sueros bovinos del banco de sueros del Departamento de Ciencias Microbiológicas de Facultad de Veterinaria de UdelaR. Las muestras fueron extraídas por venopunción coccígea y recolectadas en tubos sin anticoagulantes en el año 2009. Las mismas correspondían a ganado Holando múltiparo, clínicamente sano, perteneciente a 41 productores de los Departamentos de Florida (4/41), Durazno (27/41) y Tacuarembó (11/41).

Experimento 2

Con la finalidad de la determinación del genoma viral del BoHV-4, de un tambo del departamento de Florida con 400 vacas en ordeño se extrajo muestras de sangre de 47 vacas con antecedentes de metritis posparto, extraídas mediante venopunción coccígea y recolectadas en tubos con y sin anticoagulantes en el año 2016.

A partir de muestras de sangre anticoagulada se extrajo ADN por el método de fenol-cloroformo, el cual se basó en cuatro pasos secuenciales: lisis celular y nuclear, purificación del ADN, precipitación y lavado con etanol, y re-suspensión del ADN (Hughes et al., 1978).

Detección de anticuerpos anti BoHV-4, BoHV-1 y BVDV para ambos Experimentos (1 y 2)

Se analizó la presencia de anticuerpos contra BoHV-1, BoHV-4 y BVDV. Para esto se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto marca *Bio X Diagnostics* (BIO – ABORTION ELISA KIT, Bélgica), en el cual las placas están sensibilizadas con antígenos de los tres virus. Los sueros fueron diluidos 1:100, incubados en las microplacas sensibilizadas con los 3 antígenos diferentes durante una hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados, se agregó un conjugado anti-inmunoglobulina bovina unida a peroxidasa, se incubó nuevamente una hora a temperatura ambiente

y posterior a lavados se reveló la presencia de anticuerpos mediante una solución cromogénica (TMB- tetrametilbenzidina). La densidad óptica (DO) se determinó en un espectrofotómetro a 450 nm. Para cada muestra se calculó el coeficiente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Val (ue)} = \text{Delta DO Simple} / \text{Delta DO positivo} * 100$$

Los resultados se consideraron según la tabla número 1 y se consideró como muestras débilmente positivas las categorías + y ++ (27<=val<=81%).

Estandarización de la PCR anidada para la detección de BoHV-4 en Experimento 2

Se realizó PCR anidada para la detección del genoma viral en 17 muestras tomadas al azar, siguiendo un protocolo de amplificación descrito por Wellenberg et al. (2001). En este paso se obtuvo un fragmento de 615 pb y luego de la segunda ronda de amplificación, un fragmento de 364 pb del gen que codifica para la glicoproteína B (gB) del BoHV-4 (Campos et al., 2014). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con *Good View Nucleic Acid Stain*. Como control positivo se utilizó la cepa *Movar*, gentilmente cedida por el laboratorio de Virología del *Instituto de Ciências Básicas da Saúde* (ICBS) de la Universidad Federal de Río Grande del Sur (UFRGS) - Brasil. El mismo se utilizó a diferentes diluciones.

Secuenciación y análisis filogenético en Experimento 2

Trece productos de amplificación fueron secuenciados en ambos sentidos (Macrogen Inc., Corea) por el método *Sanger*. La alineación de las secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el programa *Bioedit* versión 2.0 que emplea la aplicación *ClustalW*. Se construyó un árbol filogenético con el software MEGA 6. Este programa permitió estimar el modelo evolutivo que más se adaptó a los datos obtenidos y construir el árbol filogenético utilizando además cepas de referencia, de Europa, de Argentina y Brasil extraídas del GenBank. La relación evolutiva se estimó utilizando el algoritmo de “vecino más próximo”. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de datos del *GenBank* (Número de acceso: MH799307, MH799308, MH799309, MH799310, MH799311, MH799312, MH799313, MH799314, MH799315, MH799316, MH799317, MH799318, MH799319).

Tabla 1. Interpretación de resultados serológicos del Kit *Bio X Diagnostics* (BIO – ABORTION ELISA KIT, Bélgica) para cada antígeno.

	0	+	++	+++	++++	+++++
BoHV-1	val<= 20%	<val<= 45%	<val<= 60%	<val<= 85%	<val<= 110%	<val
BVDV	val<= 37%	<val<= 74%	<val<= 111%	<val<= 148%	<val<= 185%	<val
BoHV-4	val<= 27%	<val<= 54%	<val<= 81%	<val<= 108%	<val<= 135%	<val

BoHV-1: Herpesvirus bovino 1
BVDV: Virus de la Diarrea Viral Bovina
BoHV-4: Herpesvirus bovino 4

Análisis de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos mediante el empleo de Microsoft Office Excel. Se elaboraron planillas donde se identificaron cada una de las muestras con un número y los resultados expresados como negativos o positivos, y mediante la prueba de χ^2 se comparó la seropositividad a BoHV-4 según el departamento de origen de las muestras, considerando un valor $p < 0,05$ para establecer diferencias significativas.

Resultados

Del total de 597 sueros (experimento 1 y 2), 195 (32,7%) fueron positivos a anticuerpos contra BoHV-4, de los cuales 128 (65,6%) fueron clasificados como “positivos débiles”. Por departamento, 34% (84/163) resultó positivo en Tacuarembó, 23% (57/247) en Durazno y 52,4% (54/103) en Florida, habiendo diferencias significativas entre departamentos (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados serológicos para BoHV-4 en rodeos lecheros por departamento estudiado

	Florida	Durazno	Tacuarembó	Total
BoHV-4 -	49 (47,6%)	190 (76,9%)	163 (66,0%)	402 (67,3%)
BoHV-4 +	54 (52,4%)	57 (23,1%)	84 (34,0%)	195 (32,7%)
Total	103	247	247	597

BoHV-4 -: Herpesvirus bovino 4 negativo, BoHV-4+: Herpesvirus bovino 4 positivo.

Del total de 597 muestras, 285 (47,7%) fueron positivas a anticuerpos contra BoHV-1, 114/597 (19,1%) fueron positivas a ambos herpesvirus (BoHV-1 y BoHV-4), las 81 muestras restantes de las 195 positivas a BoHV-4, no lo fueron para el BoHV-1. En cuanto al BVDV 564/597 animales fueron seropositivos (94,5%), 170 de los cuales (30,1%) fueron seropositivos a BoHV-4 (Tabla 3).

En cuanto a los resultados del experimento 1, de los 550 sueros analizados, se observó que todos productores tenían la mayoría de sus animales seropositivos al BVDV, mientras que para el BoHV-4 siete (7/41) productores (5 de Durazno y 2 de Tacuarembó) no presentaron animales seropositivos para este virus, mientras que los productores de Florida todos tenían algún animal seropositivo a BoHV-4. Para BoHV-1 cinco (5/41) productores no presentaron animales con serología positiva contra este virus (Tabla 4).

Tabla 3. Frecuencia de los animales según serología a BoHV-1, BoHV-4 y BVD

	BoHV-4 +	BoHV-4 -
BoHV-1 +	114/195	171/402
BoHV-1 -	81/195	231/402
BVD +	170/195	394/402
BVD -	25/195	8/402

BoHV-4+: Herpesvirus bovino 4 positivo
BoHV-4 -: Herpesvirus bovino 4 negativo
BoHV-1+: Herpesvirus bovino 1 positivo
BoHV-1 -: Herpesvirus bovino 1 negativo
BVD+: Diarrea Viral Bovina positivo
BVD -: Diarrea Viral Bovina negativo

Tabla 4. Serología para cada virosis por productor y departamento

Departamento	Productor	BoHV-4 -	BoHV-4 +	BoHV-1 -	BoHV-1 +	BVD -	BVD+	Total animales
Durazno	2	14	4	15	3	0	18	18
Durazno	3	3	2	5	0	0	5	5
Durazno	4	3	1	4	0	0	4	4
Durazno	5	8	1	6	3	0	9	9
Durazno	6	9	0	4	5	0	9	9
Durazno	7	6	4	5	5	0	10	10
Durazno	8	4	2	3	3	0	6	6
Durazno	9	7	2	3	6	0	9	9
Durazno	10	5	0	1	4	0	5	5
Durazno	11	3	2	4	1	0	5	5
Durazno	12	32	4	27	9	0	36	36
Durazno	13	5	3	2	6	0	8	8
Durazno	14	1	0	0	1	0	1	1
Durazno	16	16	1	13	4	0	17	17
Durazno	17	4	5	2	7	0	9	9
Durazno	18	1	0	1	0	0	1	1
Durazno	19	7	1	5	3	1	7	8
Durazno	20	4	1	3	2	0	5	5
Durazno	21	3	1	3	1	0	4	4
Durazno	23	3	0	2	1	0	3	3
Durazno	25	3	1	3	1	0	4	4
Durazno	26	9	4	5	8	0	13	13
Durazno	27	8	4	3	9	1	11	12
Durazno	28	2	0	1	1	0	2	2
Durazno	29	10	4	9	5	0	14	14
Durazno	30	10	5	7	8	1	14	15
Durazno	41	8	3	5	6	0	11	11
Florida	1	2	4	6	0	0	6	6
Florida	15	12	3	14	1	0	15	15
Florida	22	13	6	15	4	0	19	19
Florida	24	15	1	15	1	0	16	16
Tacuarembó	0	33	16	14	35	0	49	49
Tacuarembó	31	26	8	5	29	0	34	34
Tacuarembó	32	15	4	13	6	0	19	19
Tacuarembó	33	9	1	3	7	0	10	10
Tacuarembó	34	13	8	9	12	0	21	21
Tacuarembó	35	18	12	9	21	0	30	30
Tacuarembó	36	9	23	25	7	0	32	32
Tacuarembó	37	13	3	8	8	0	16	16
Tacuarembó	38	17	9	18	8	0	26	26
Tacuarembó	39	4	2	5	1	0	6	6
Tacuarembó	40	8	0	8	0	0	8	8

BoHV-4+: Herpesvirus bovino 4 positivo, BoHV-4 -: Herpesvirus bovino 4 negativo.
BoHV-1+: Herpesvirus bovino 1 positivo, BoHV-1 -: Herpesvirus bovino 1 negativo.
BVD+: Diarrea Viral Bovina positivo, BVD -: Diarrea Viral Bovina negativo.

De 47 animales del departamento de Florida, correspondientes al experimento 2, 40 (85,1%) fueron seropositivos a BoHV-4. De estas, se eligieron 17 muestras al azar que fueron procesadas mediante PCR anidado para la detección del genoma de BoHV-4, obteniéndose 4 negativos y 13 positivos (Fig. 1). Posteriormente, se enviaron a secuenciar las 13 amplificaciones obtenidas, generando así la filogenia correspondiente a un fragmento del gen gB del BoHV-4. Las 13 secuencias uruguayas fueron comparadas con otras 25 secuencias de BoHV-4, y se utilizó como grupo externo el *Macaca mulatta* rhadinovirus (Fig. 2). El alineamiento del árbol filogenético demostró un alto nivel de identidad (97,2%) entre las cepas uruguayas y de otros países.

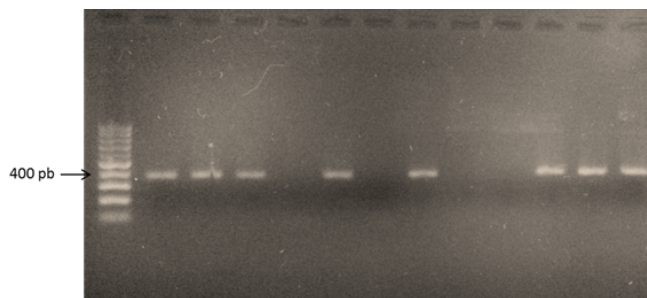


Figura 1. Gel de agarosa al 1,5% de la PCR anidada donde se observa la amplificación del fragmento de 364 pb correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína B de BoHV-4. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 2, 3, 4, 6 y 8 se observan 5 muestras positivas, en los carriles 5, 7 y 9 muestras negativas, en el carril 10 el control negativo (agua ultra pura), en el carril 11 el control positivo a una dilución de 1/100, en el carril 12 el control positivo a 1/500, y en el carril 13 el control positivo a una dilución de 1/1000.

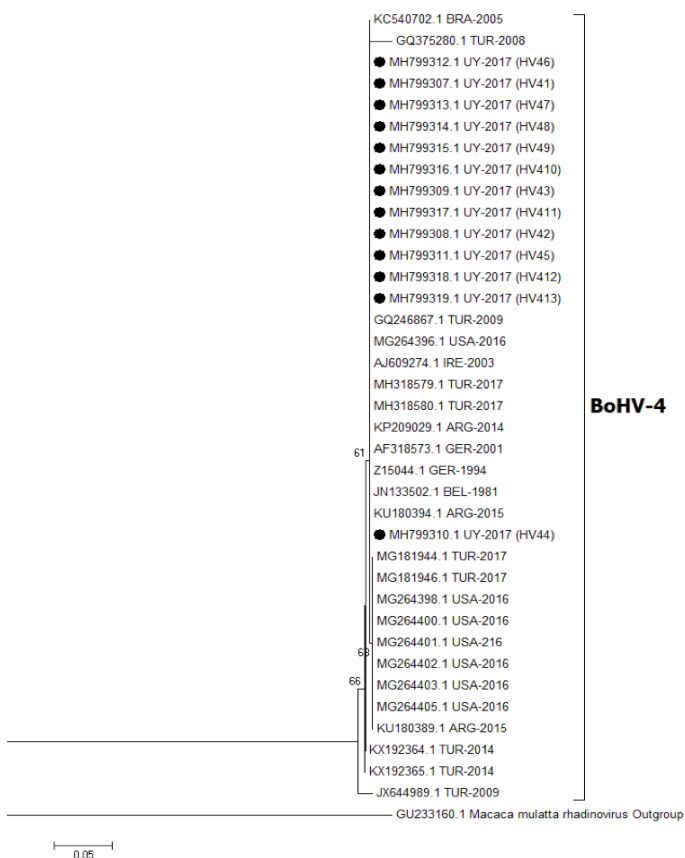


Figura 2. Árbol filogenético del fragmento del gen que codifica para la glicoproteína B (gB) de BoHV-4. Se muestra la relación filogenética de las secuencias de Uruguay (rombo negro) (Número de acceso: MH799307, MH799308, MH799309, MH799310, MH799311, MH799312, MH799313, MH799314, MH799315, MH799316, MH799317, MH799318, MH799319) y cepas de referencia depositadas en el GenBank provenientes de Brasil, Argentina, Turquía, Alemania, Bélgica, EE.UU, Irlanda. El análisis incluyó 38 secuencias de BoHV-4 y como virus externo el *Macaca mulatta* rhadinovirus.

Discusión

En Uruguay hasta el momento, se desconocía la situación de BoHV-4 en la población bovina, siendo este el primer reporte de la detección serológica y molecular del virus. En diferentes partes del mundo BoHV-4 se ha asociado con una amplia variedad de cuadros clínicos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos y endometritis, e incluso se ha identificado en animales sanos (Izumi et al., 2006; Bilge et al., 2012), y en bovinos lecheros con repetición de celo (Kale et al., 2011).

En los países en los que se ha detectado el virus, las prevalencias serológicas encontradas han variado de 16 a 30%, con títulos de anticuerpos neutralizantes de 1:8 a 1:64 (Frazier et al., 2002). En un estudio realizado en Colombia en el año 2013, en el cual se estudiaron 7 predios, encontraron todos los rodeos seropositivos a BoHV-4 y una seropositividad del 72,4% (Motta et al., 2013).

En el presente estudio se detectó un 32,7% de seropositividad a BoHV-4, habiendo uno de los establecimientos con un 85% de los animales estudiados positivos. Del total de muestras analizadas, más del 50% fueron clasificadas como débilmente positivas. Esto concuerda con otros estudios que sugieren que la respuesta inmune humoral del ganado después de la infección BoHV-4 se caracteriza por una escasa producción de anticuerpos neutralizantes con baja avidéz (Thiry et al., 1990; Donofrio et al., 2000), pero sí son detectables mediante la técnica ELISA. En cuanto a la posibilidad de que exista reacción cruzada entre BoHV-4 y otros herpesvirus bovinos relacionados, Krüger et al., (2015b) no encontraron reacción cruzada entre anticuerpos específicos contra BoHV-1 y BoHV-4 mediante ELISA. En el presente trabajo el 47,7% (285/597) de los animales fueron positivos a BoHV-1, mientras que 13,6% (81/597) fueron negativos a BoHV-1 y positivos a BoHV-4 y a la inversa, el 28,6% (171/597) de los animales fueron positivos a BoHV-1 y negati-

vos a BoHV-4. Costa et al., (2011) encontraron bovinos coinfectados con BoHV-4 y BoHV-5 mediante la detección de ADN de ambos virus en muestras del sistema nervioso central. Coinfecciones entre BoHV-1 y BoHV-4 también fueron demostradas previamente en ganglios trigéminos (Campos et al. 2014). En cuanto a la seroprevalencia encontrada en este estudio para el BVDV, alrededor de un 95%, supera a los estudios anteriores (Repiso et al., 2005; Guarino et al., 2008; Maya et al., 2016) concordando en que la totalidad de los predios tienen al menos un animal positivo. Por lo tanto con estos resultados, no se puede descartar que los antecedentes de los problemas reproductivos en los establecimientos muestreados, se deban a otras virosis como BoHV-1 o BVDV.

De la filogenia obtenida, se destaca que las cepas de BoHV-4 de Uruguay están agrupadas con otras cepas de la región (Brasil y Argentina), y otros países del mundo como Turquía y Estados Unidos. Esto confirma que la región amplificada es de una región conservada del gen ORF8 que codifica la glicoproteína B. De tal modo que no hubo variación entre las muestras aisladas desde 1981 hasta el presente en diferentes países. Conservándose efectivamente entre los distintos aislados de BoHV-4 en diferentes regiones del mundo. Se debería analizar la importancia de estos hallazgos, ya sea para entender el origen de estas cepas, así como también para evaluar si hay posibles diferencias en cuadros clínicos según las cepas actuantes. En Argentina se encontró una alta variabilidad de cepas aisladas de muestras de vacas que presentaron abortos, resaltándose así el significado de las investigaciones moleculares sobre el papel del virus como agente infeccioso asociado a enfermedad reproductiva en el ganado bovino (Morán et al., 2015). Donofrio et al. (2009) aislaron y secuenciaron BoHV-4 del útero de vacas afectadas con metritis posparto. Otro estudio confirmó en 9 casos analizados, a este virus como potencial causante de aborto (Verna et al. 2012). A pesar de estas observaciones, estudios adicionales, incluyendo reproducciones experimentales, son necesarios para comprender mejor si BoHV-4 tiene un rol causal en los cuadros clínicos con los que se lo ha asociado en estudios observacionales.

Si bien en la actualidad, las enfermedades infecciosas cada día ocupan un papel más importante, en Uruguay existen pocas evidencias de los agentes infecciosos involucrados a nivel reproductivo. En base a esa escasez de información epidemiológica oficial y actualizada y por la falta en muchos casos de un diagnóstico etiológico definitivo, la estrategia más empleada por los productores es la aplicación masiva de vacunas polivalentes en los rodeos bovinos, buscando mejorar el nivel inmunitario de los animales que permita minimizar las pérdidas reproductivas. La justificación de conocer a ciencia cierta los agentes responsables de las fallas reproductivas, se debe a que para algunos agentes como *Neospora caninum* y en este caso BoHV-4, no existen vacunas comerciales. Por lo tanto, y en caso de que se demuestre que BoHV-4 es un importante agente en Uruguay, se deberían buscar estrategias de prevención y control distintas a la vacunación, teniendo en cuenta que no existe inmunidad cruzada frente a este y otros herpesvirus que sí están en las vacunas reproduc-

tivas, como BoHV-1. En base a esto, se considera necesario profundizar los estudios sobre la presencia de BoHV-4 a nivel del rodeo nacional tanto en ganadería de carne como de leche, involucrando además las posibles interacciones con los demás agentes causantes de fallas reproductivas como BVDV, IBRV, *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, *Campylobacter fetus* y otros agentes abortivos identificados en el país (Easton, 2006).

En conclusión, este trabajo demuestra por primera vez la presencia de BoHV-4 en bovinos en Uruguay. Se desconoce completamente el eventual rol causal del BoHV-4 en distintos cuadros clínicos y su potencial impacto en la salud animal, lo que deja abierta la discusión sobre la necesidad de profundizar el estudio de esta infección viral.

Financiación y agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación en Innovación (FSSA_X_2014_1_105283 – ANII) y el Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República.

Agradecemos al Dr. Agustín Furtado por su colaboración y aportes en la redacción de este artículo.

Referencias bibliográficas

- Arede, D., Chigerwe, M., Crossley, B. (2018). Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiol Infect*, 146, 904–912.
- Bielefeldt, H. (1995). The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Ani Prac*, 11, 447–476.
- Bilge, S., Alkan, F., Caliskan, E., Yildirim, Y., Oguzoglu, T. C., Can Sahna, K., Burgu, I. (2012). The investigation of the herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) on the occurrence of the reproductive disorders in dairy cattle herds, Turkey. *Rev Méd Vet*, 163, 206-211.
- Campos, F. S, Franco, A. C., Oliveira, M. T., Firpo, R., Strelczuk, G., Fontoura, F. E., Kul-mann, M. I. R., Maidana, S., Romera, S. A., Spilki, F. R., Silva, A. D., Hubner, S. O., Roehe, P. M. (2014). Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 171(1-2), 182 – 188.
- Chastant-Maillard, S. (2013). Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transbound Emerg Dis*, 62(3), 245 - 251.
- Costa, E., Vasconcelos, A., Bomfim, M., Amorim, H., Lima, G., Coelho, F., Resende, M. (2011). Neurological disorder in

- cattle associated with bovine herpesvirus 4. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 63, 828-835.
- Delooz, L., Czaplicki, G., Houtain, J. Y., Dal Pozzo, F., Saegerman, C. (2017). Laboratory Findings Suggesting an Association Between BoHV-4 and Bovine Abortions in Southern Belgium. *Transbound Emerg Dis*, 64, 1100-1109.
- Donofrio, G., Flammini, C., Scatozza, F., Cavirani, S. (2000). Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J Clin Microbiol*, 38, 4668-71.
- Donofrio, G., Franceschi, V., Capocéfalo, A., Cavirani, S., Sheldon, I. M. (2009). Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post-partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 83.
- Easton, María Cristina (2006). *Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay* (Tesis de Maestría en Salud Animal). Universidad de la República. Facultad de Veterinaria, Montevideo.
- Frazier, K. S., Baldwin, C. A., Pence, M., West, J., Bernard, J., Liggett, A., Miller, D., Hines, M. E. (2002). Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J Vet Diagn Invest*, 14, 457-462.
- Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M. V., Gil, A., Dargatz, D. A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*, 85(1-2), 34-40.
- Hughes, S. H., Shank, P. R., Spector, D. H., Kung, H. J., Bishop, J. M., Varmus, H. E., Vogt, P. K., Breitman, M. L. (1978). Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. *Cell*, 15, 1397-1410.
- ICTV (2018). International Committee on Taxonomy of Viruses: Taxonomy. Recuperado de: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (Fecha de consulta: 19/08/2019).
- Izumi, Y., Tsuduku, S., Murakami, K., Tsuboi, T., Konishi, M., Haritani, M., Kamiyoshi, T., Kimura, K., Sentsui, H. (2006). Characterization of bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *J Vet Med Sci*, 68, 189-193.
- Jones, C., Geiser, V., Henderson, G., Jiang, Y., Meyer, F., Pérez, S., Zhang, Y. (2006). Functional analysis bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol*, 113 (3-4), 199-210.
- Kale, M., Ata, A., Kocamüftüoğlu, M., Hasircioğlu, S. (2011). Bovine herpes virus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Act Vet Beograd*, 61, 13-19.
- Krüger, E., Penha, T., Eira, D., Roehle, P., Ribeiro, M., Soccol, T. (2015a). Bovine herpesvirus 4 in Parana State, Brazil: case report, viral isolation, and molecular identification. *Soc Brasileira de Microbiol*, 46 (1), 279-283.
- Krüger, E. R., Penha, T. R., Hummelgen, F. C., Agottani, J. B., Reva, D., Gonçalves, R., Thomaz-Soccol, V. (2015b). Development and evaluation of an indirect ELISA: Serological survey to detect specific antibodies to bovine herpesvirus 4. *Brazilian Arch Biol Technol*, 58(5), 725 - 731.
- Maya, L., Puentes, R., Reolon, E., Acuña, P., Riet, F., Rivero, R., Cristina, J., Colina, R. (2016) Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch Virol*, 161(3), 529 – 535.
- Macías-Rioseco, M., Mirazo, S., Uzal, F. A., Fraga, M., Silveira, C., Maya, L., Riet-Correa, F., Arbiza, J., Colina, R., Anderson, M. L., Giannitti, F. (2019). Fetal Pathology in an Aborted Holstein Fetus Infected With Bovine Parainfluenza Virus-3 Genotype A. *Vet Pathol*, 56(2), 277-281.
- Morán, P. E., Pérez, S. E., Odeón, A. C., Verna, A. E. (2015). Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 47(2), 155-166.
- Monge, A., Elvira, L., Gonzalez, J. V., Astiz, S., Wellenberg, G. J. (2006). Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci*, 80, 120-125.
- Motta, J., García, I., Abeledo, M. A. (2013). Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino 1 y herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caquetá, Colombia. *Rev Salud Anim*, 35 (3), 174 – 186.
- Repiso, M. V., Gil, A., Bañales, P., D' Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., Herrera, B., Núñez, A., Olivera, M. A., 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 (Montev.)* 40, 5-28.
- Thiry, E., Dubuisson, J., Bublot, M., Van Bresselem. M. F., Pastoret, P. P. (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 97, 72-77.
- Uruguay XXI (2015). Ganadería Bovina. En: *Agronegocios* (Parte 2, sección 2.3, capítulo 2.3.1.). Recuperado de: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2015/06/Informe> (Fecha de consulta: 16/11/2017).
- Verna, A. E., Leunda, M. R., Louge Uriarte, E. L., Lomónaco, M., Pereyra, S. B., Odeón, A. C. (2008). Primera evidencia virológica de herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) en Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 40(1), 53 – 55.
- Verna, A. E., Manrique, J. M., Pérez, J., Leunda, M., Pereyra,

S. B., Jones, L. R., Odeón, A. C. (2012). Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: High genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet Microbiol*, 160, 1-8.

Welchman, D. D. B., Verkuijl, A. M., Pepper, W. J., Ibata, G., King, S. A., Davidson, H. M., Mawhinney, I. C., Banks, M. (2012). Association of gammaherpesviruses and bacteria with clinical metritis in a dairy herd. *Vet Rec*, 170, 207-209.

Wellenberg, G. J., Verstraten, E. R. A. M., Belak, S., Verschuren S. B. E., Rijsewijk, F. A. M., Peshev, R., Van Oirschot, J. T. (2001). Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods*, 97, 101-112.

Notas de contribución:

1. Concepción y diseño del estudio, 2. Adquisición de datos, 3. Análisis de datos, 4. Discusión de los resultados, 5. Redacción del manuscrito, 6. Aprobación de la versión final del manuscrito. Laureana De Brun ha contribuido en 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Valeria da Silva ha contribuido en 1, 2, 3 y 5. Cecilia Castro ha contribuido en 1, 2 y 3. Lucia Rivero ha contribuido en 1, 2 y 3. Marcos Mionetto ha contribuido en 1, 2 y 3. Federico Rodriguez ha contribuido en 1, 2 y 3. Fabricio Campos ha contribuido en 1, 3, 4, 5, 6. Rodrigo Puentes ha contribuido en 1, 2, 3, 4, 5, 6.

El editor Cecilia Cajarville aprobó ese artículo.

4.3 Experimento número 3:

“Evaluar la inmunogenicidad de cuatro vacunas comerciales contra BoHV-1 utilizadas en nuestro país. (Artículo científico N° III)”





Animales

- A) Este experimento se llevó a cabo en un establecimiento ganadero ubicado en el Departamento de Lavalleja, Uruguay. De un rodeo con aproximadamente 1000 bovinos Herefords, se seleccionaron 120 vaquillonas seronegativas contra BoHV-1 y se dividieron en ocho grupos de 15 animales cada uno. Se aplicaron diferentes protocolos de inmunización, estando cada grupo detallados en el artículo N° III. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético en el Uso de Animales (CEUA-FVET-972 Exp. 111900-0001057-19).



Article

Field Evaluation of Commercial Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (Ibr) Virus Using Different Immunization Protocols

Laureana De Brun ^{1,†}, Mauro Leites ^{1,†}, Agustín Furtado ¹, Fabricio Campos ², Paulo Roehe ³
and Rodrigo Puentes ^{1,†}

¹ Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay; laureana@fvet.edu.uy (L.D.B.); maurolei@gmail.com (M.L.); afurtado@fvet.edu.uy (A.F)

² Laboratório de Bioinformática & Biotecnologia, Campus de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi 77410-530, Brazil; camposvet@gmail.com

³ Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90050-170, Brazil; proehe@gmail.com

* Correspondence: rpuentes@fvet.edu.uy; Tel.: +598-2-1903 (int. 2510)

† These authors contributed equally to this work.

Principales aportes de este trabajo:

- Una vacuna comercial para BoHV-1 generó niveles de anticuerpos neutralizantes considerados protectores en la mayoría de los animales (86%), habiendo por otra parte vacunas que no lograron estimular a ningún animal 30 días luego de la segunda inmunización.
- No se encontraron interferencias estadísticamente significativas en la inmunización simultánea entre BoHV-1 con vacunas clostridiales o contra la Fiebre Aftosa
- Cuando se utilizaron diferentes marcas entre la primera dosis y segunda dosis, se logró una respuesta intermedia utilizando dos marcas distintas del inmunógeno.

Article

Field Evaluation of Commercial Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (Ibr) Virus Using Different Immunization Protocols

Laureana De Brun ^{1,†}, Mauro Leites ^{1,†}, Agustín Furtado ¹, Fabricio Campos ², Paulo Roehé ³
and Rodrigo Puentes ^{1,*}

¹ Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay; laureana@fvet.edu.uy (L.D.B.); maurolei@gmail.com (M.L.); afurtado@fvet.edu.uy (A.F.)

² Laboratório de Bioinformática & Biotecnologia, Campus de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi 77410-530, Brazil; camposvet@gmail.com

³ Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90050-170, Brazil; proehe@gmail.com

* Correspondence: rpuentes@fvet.edu.uy; Tel.: +598-2-1903 (int. 2510)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: *Bovine alphaherpesvirus 1* is ubiquitous in cattle populations and is associated with several clinical syndromes, including respiratory disease, genital disease, infertility and abortions. Control of the virus in many parts of the world is achieved primarily through vaccination with either inactivated or live modified viral vaccines. The objective of this study was to evaluate the performance of four commercially available BoHV-1 vaccines commonly used in Central and South America. Animals were divided into eight groups and vaccinated on days 0 and 30. Groups 1 to 4 received two doses of four different BoHV-1 commercial vaccines (named A to D). Groups 5 and 6 received vaccine D plus a vaccine for either Clostridial or Food-and-Mouth-Disease (FMD), respectively. Group 7 received one dose of two different brands of reproductive vaccines. Serum samples were collected from all animals on days 0, 30 and 60 to evaluate neutralizing and isotype-specific (IgG1 and IgG2) antibodies. Of the four commercial vaccines evaluated, only vaccine A induced neutralizing antibodies to titers $\geq 1:8$ in 13/15 (86%) of the animals 60 days post-vaccination. Levels of IgG2 antibody increased in all groups, except for group 2 after the first dose of vaccine B. These results show that only vaccine A induced significant and detectable levels of BoHV-1-neutralizing antibodies. The combination of vaccine D with Clostridial or FMD vaccines did not affect neutralizing antibody responses to BoHV-1. The antibody responses of three of the four commercial vaccines analyzed here were lower than admissible by vaccine A. These results may be from vaccination failure, but means to identify the immune signatures predictive of clinical protection against BoHV-1 in cattle should also be considered.

Keywords: BoHV-1; BoHV-1 vaccines in a field herd; Clostridial; FMD



Citation: De Brun, L.; Leites, M.; Furtado, A.; Campos, F.; Roehé, P.; Puentes, R. Field Evaluation of Commercial Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (Ibr) Virus Using Different Immunization Protocols. *Vaccines* **2021**, *9*, 408. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040408>

Academic Editor: Ralph A. Tripp

Received: 20 February 2021

Accepted: 31 March 2021

Published: 20 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) produces a wide variety of clinical manifestations, including infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis and balanoposthitis (IPV and IPB), infertility, abortion and systemic infection in newborn calves, collectively causing substantive economic losses for cattle production chains worldwide. BoHV-1 isolates are taxonomically divided into three different genotypes and subgenotypes, based on their antigenic and genomic characteristics, named BoHV-1.1, BoHV-1.2a and BoHV-1.2b [1,2].

Following infection, BoHV-1 (like other herpesviruses) establishes latent infections in neuronal ganglia [3,4]. During latency, the virus remains in a non-replicative state

in the form of episomes in the nuclei of infected cells. Upon reactivation, infectious virions can then be shed and become a source of infection to other animals. Reactivation can be experimentally induced by several stimuli, such as transport, parturition and administration of glucocorticoids [5]. This peculiarity allows the virus to go undetected and thus persist in herds, ensuring perpetuation of the virus [6].

The infection is widely distributed throughout the world, with large differences in prevalence between countries. It is present in nearly all the countries of the Americas, Australia, New Zealand and some countries of Europe, Asia and Africa. In Uruguay, the disease is highly prevalent [7]. When BoHV-1-infected bulls are introduced into a herd, it has a negative impact on reproductive performance from low conception rate to abortions [8]. Vaccination for BoHV-1 is thought to minimize reproductive losses and prevent clinical signs in cattle, such as respiratory symptoms and conjunctivitis. A recently published meta-analysis shows that the BoHV-1 vaccine is associated with a 60% decrease in the risk of bovine abortion [9]. Inactivated BoHV-1 vaccines can be safely used in pregnant animals and so are widely used in breeding herds with other vaccines for pathogens, such as Bovine Viral Diarrhea (BVD), *Leptospira spp* and *Campylobacter fetus*. Other immunogens, such as Clostridial antigens, and Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) are often applied simultaneously with vaccines against infectious diseases that affect reproduction in cattle. However, it is not clear whether such immunization protocols interfere with the immune response against BoHV-1.

Primary BoHV-1 infection induces strong humoral and cell-mediated immune responses in cattle, as would be expected under normal conditions [10,11]. The serum neutralization (SN) test used to quantify BoHV-1 neutralizing antibodies in sera of cattle is recommended by the World Organization for Animal Health (OIE). SN has been used extensively to evaluate vaccines [11–14], although there is a difference in the titers obtained according to the sample used [15]. Moreover, it has been shown that the efficacy of the immune response against BoHV-1 depends on increased Th1-type cell-mediated responses [16]. The measurement of subclass-specific (IgG1 and IgG2) levels in serum allows an indirect estimate of the profile of the cellular immune response induced after vaccination. Thus, elevated IgG1 levels are related to a Th2 response profile, while high IgG2 levels are associated with a Th1 profile [17,18].

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of four inactivated BoHV-1 vaccines commonly available in Uruguay by measuring levels of neutralizing antibodies and specific immunoglobulin subclasses induced by the vaccines. Responses were also evaluated when Clostridial or Foot and Mouth Disease (FMD) vaccines were applied simultaneously.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The experiment was carried out in a livestock farm located in the Lavalleja Department, Uruguay. From a herd with approximately 1000 Herefords, 120 heifers seronegative against BoHV-1 were selected and divided into eight groups of 15 animals each. The experimental protocols for the cattle studies performed in this paper were approved by Animal Use Ethics Commission (CEUA) from the Universidad de la República Oriental del Uruguay (approval number CEUAFVET-972, Exp. 111900-001057-19).

2.2. Vaccination Protocols

The animals were divided into 8 groups of 15 animals each. Groups 1 to 4 received two doses (day 0 and day 30) of different commercial BoHV-1 vaccines. Groups 5 and 6 received a BoHV-1 vaccine in combination with a vaccine for Clostridial (double dose—days 0 and 30) or FMD (single dose—day 0) and group 7 received different brands of reproductive vaccine in each dose. The control group (group 8) was not vaccinated and they were kept in the same herd as the vaccinated animals. (Table 1).

Table 1. Groups of animals ($n = 15$) and vaccines used in this study.

Groups	Vaccines
1	A
2	B
3	C
4	D
5	D + Clostridial vaccine
6	D + FMD vaccine
7	A (1st dose) + D (2nd dose)
Control	Non-vaccinated

FMD: Foot and Mouth Disease.

Blood was collected by coccygeal venipuncture on days 0, 30 and 60 from all animals and sera were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing.

2.3. Vaccines

Six different commercial vaccines with the following antigens were used:

1. Vaccine A: inactivated suspension of BoHV-1, bovine viral diarrhea virus (BVDV)-1, *Campylobacter fetus*, *Histophilus somni* and *Leptospira spp* in aluminum hydroxide adjuvant.
2. Vaccine B: inactivated suspension of BoHV-1, BoHV-5; BVDV-1, BVDV-2; *Leptospira spp* and *Campylobacter fetus* in aluminum hydroxide adjuvant.
3. Vaccine C: inactivated BoHV-1, BVDV-1, *Campylobacter fetus*, *Leptospira spp* and *Histophilus somni* in aluminum hydroxide adjuvant.
4. Vaccine D: inactivated suspension of BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1, BVDV-2, *Leptospira spp* and *Campylobacter fetus* in oil—adjuvant.
5. Clostridial vaccine: Bacterin-toxoid combined with a water-soluble adjuvant containing *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens* types B and C and *Clostridium perfringens* type D.
6. FMD vaccine: Oil emulsion vaccine containing inactivated Foot and Mouth Disease Virus types O1 Campos and A24 Cruzeiro.

For informational purposes, the reproductive vaccines used were (listed in alphabetical order): BIOABORTOGEN[®] H—Biogénesis—Bagó, Buenos Aires, Argentina; BOVISAN TOTAL Se[®]—Virbac, Montevideo, Uruguay; TRANSVAC[®]—Merial, Buenos Aires, Argentina; and VAC-SULES REPRODUCTIVA FORTE[®]—Microsules, Montevideo, Uruguay. The order of appearance of the marks does not necessarily coincide with the description A to D.

2.4. Serum Neutralization (SN) Test

Serum samples were submitted to a serum neutralization (SN) test for detection of antibodies to BoHV-1, according to the OIE protocol [19]. Briefly, 50 μL of a two-fold dilution of each serum was mixed with an equal volume of a suspension containing 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of BoHV-1 Los Angeles strain (LA—BoHV-1.1). After 24 h incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 μL of a cell suspension (3×10^4 cells) was added to wells and plates incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO₂ incubator. Plates were examined for cytopathic effect (CPE) using a light microscope daily for five days. Antibody titers were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that prevented the induction of CPE after 5 days of incubation. SN antibody titers $\geq 1:8$ was used as the cut-off for protection [20].

2.5. Indirect ELISA

For the quantification of BoHV-1-specific total IgG, IgG1 and IgG2, three indirect ELISAs were developed. A stock ELISA antigen was prepared on MDBK cells infected with BoHV-1 LA strain at a multiplicity of infection (MOI) between 0.1 and 1 and further treated with 0.2% N-octyl-glucopyranoside (OGP) following previously described methods [11]. Class and subclass-specific peroxidase conjugates (anti-bovine IgG, IgG1 and IgG2 antibodies) were purchased commercially and employed following the manufacturers' instructions (Jackson ImmunoResearch Laboratories INC, West Grove, PA, USA). The plates were coated with a 1:1500 dilution of the antigen in bicarbonate buffer overnight at 4 °C. After the adsorption of the antigen, plates were washed once with 100 µL of PBST-20 (0.5% Tween 20 in 83.3 mM KH₂PO₄, 66 mM Na₂HPO₄, 14.5 mM NaCl), filled with another 100 µL of PBST-20 and allowed to stand at room temperature for 1 h. For testing, sera were diluted 1:2 in PBST-20 and added to wells in duplicate. After 1 h incubation at 37 °C, plates were washed three times with PBST-20. Class or subclass-specific peroxidase conjugates (diluted in PBS as previously titrated) were then added to wells and the plates were again incubated for 1 h at 37 °C. After another series of washings with PBST-20, 100 µL of the substrate ortho-phenylenediamine (OPD; Sigma, Darmstadt, Germany) with 0.03% H₂O₂ were added to plates [11]. After 30-min incubation at room temperature, the optical density (OD) was determined at 405 nm in a Multiskan (Titertek, Waltham, Massachusetts, EUA) ELISA reader.

2.6. Statistical Analysis

Fisher's exact test was used in the analysis of contingency tables and a Student's *t* test was conducted to compare the means between groups for the different isotypes considering the time factor (GraphPad Prism 6). The significance level was $p < 0.05$.

3. Results

The results of the neutralizing antibody titrations of each experimental group are shown in Table 2 and a supplemental file is provided with the complete results. Only vaccine A induced antibody titers $\geq 1:8$ in most animals (86%) at day 60.

Table 2. Neutralization antibodies for BoHV-1 at 30 and 60 days post-vaccination (dpv) in cattle immunized with four commercial vaccines.

Groups	Vaccines	Number of Animals	Reagents	
			30 dpv	60 dpv
1	A	15	4 * #4(8)	13 ^{*,a} #2(8) #2(12) #2(16) #1(24) #5(32) #1(64)
2	B	15	0 *	0 ^b
3	C	15	1 * #1(8)	1 ^b #1(8)
4	D	15	2 * #2(8)	3 ^b #2(8) #1(16)
5	D + Clostridial	15	3 * #2(8) 1(12)	3 ^{b,c} #2(16) #1(24)
6	D + FMD	15	1 * #1(8)	1 ^{*,b} #1(8)

Table 2. Cont.

Groups	Vaccines	Number of Animals	Reagents	
			30 dpv	60 dpv
7	A (1a dose) + D (2a dose)	15	2 * #2(8)	5 *,c #1(8) #1(12) 3(16)
Control	Non-vaccinated	15	0 *	0 *,b

* Number of reactive animals; # Number of animals and neutralizing antibody titers detected (in parentheses). All animals were seronegative for SN test at day 0. The different letters (^a, ^b and ^c) show significant differences ($p < 0.05$).

The indirect ELISA for total antibodies ($p < 0.05$) relative to IgG1 and IgG2 against BoHV-1 demonstrated that commercial vaccine A used in group 1 induced higher titers of antibodies ($p < 0.05$) compared to the groups that received vaccines C and D, while vaccine B did not induce detectable antibodies in any of the samples collected (Figure 1A).

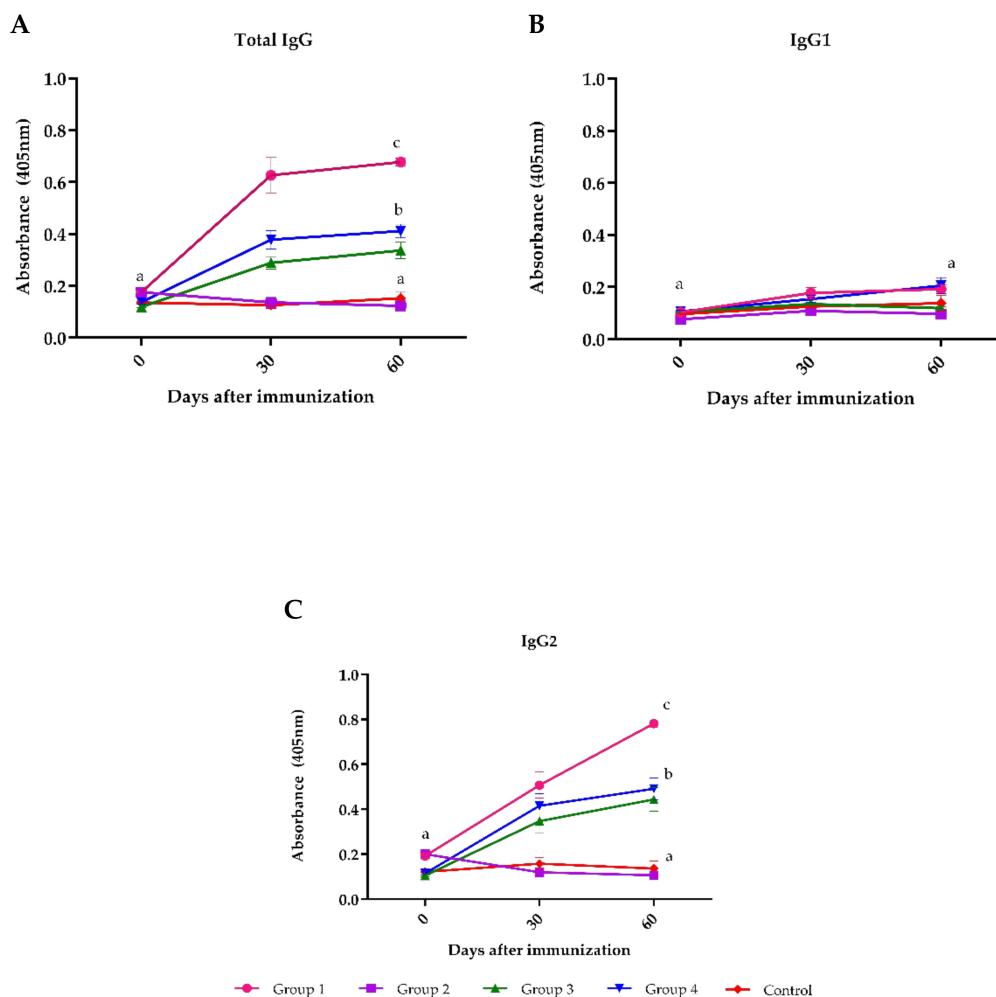


Figure 1. Antibodies to BoHV-1 evaluated by ELISA in sera of cattle immunized with four commercial BoHV-1 vaccines. Group 1 = vaccine A; group 2 = vaccine B; group 3 = vaccine C; group 4 = vaccine D; and Control group (not vaccinated). Mean titers \pm standard errors (SEM) are depicted. Letters (a, b and c) highlight significant differences ($p < 0.05$) between groups. **A:** Total IgG antibodies. **B:** IgG1 subclass antibodies. **C:** IgG2 subclass antibodies.

The subclass-specific antibody revealed a low IgG1 response in all groups (Figure 1B), while IgG2 showed a significant increase in groups 1, 3 and 4 on day 60 post-immunization (Figure 1C).

Additionally, the antibody response against BoHV-1 was evaluated when other vaccines were given simultaneously (Clostridial—group 5 or FMD—group 6). At day 30, the animals immunized with BoHV-1 + Clostridial or BoHV-1 + FMD produced a significantly lower antibody response than the group immunized only with BoHV-1. However, on day 60, this difference had disappeared (Figure 2A). For the antibody subclasses analyzed, a weak IgG1 response was evident in all groups at 30 and 60 days after immunization (Figure 2B), while IgG2 showed a significant increase in vaccinated groups 4, 5 and 6 on day 60 of the experiment (Figure 2C).

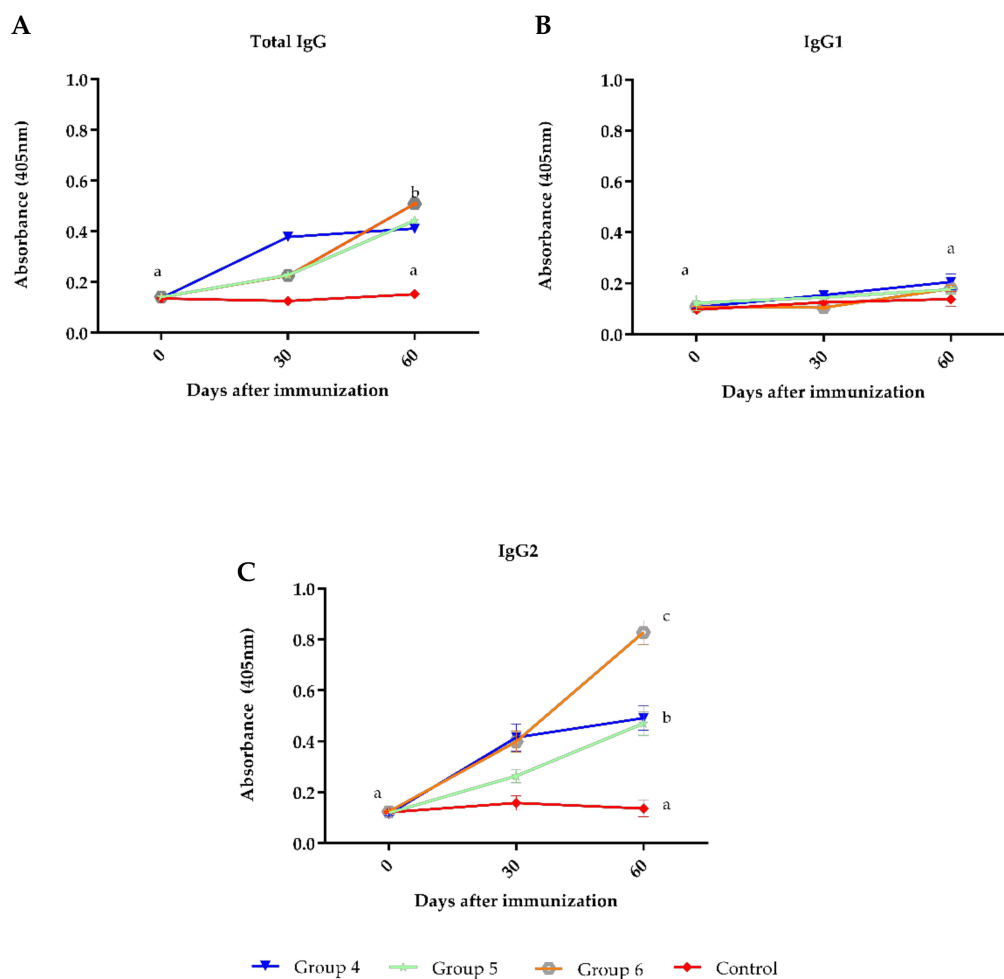


Figure 2. Antibodies to BoHV-1 evaluated by ELISA in sera of cattle immunized with commercial reproductive vaccines applied simultaneously with Clostridial or FMD vaccines. Group 4 = vaccine D; group 5 = vaccine D + Clostridial vaccine; group 6 = vaccine D + FMD vaccine and Control group (not vaccinated). Mean titers \pm standard errors (SEM) are shown. Letters (a, b and c) highlight significant differences ($p < 0.05$) between groups. **A:** Total IgG antibodies. **B:** IgG1 subclass antibodies. **C:** IgG2 subclass antibodies.

The antibody titer showed that on day 60, the titers were significantly different when the vaccine brand was changed between the first and second dose (group 7—vaccine D on day 0 and vaccine A on day 30). At day 60, vaccine A induced the highest antibody titers, while vaccine D induced the lowest antibody titers ($p < 0.05$). When the vaccine brand between both immunizations was changed (group 7), the response at day 60, an intermediate response between the response of vaccine A and D (Figure 3A), was achieved. For the antibody

subclasses analyzed, IgG1 level was not different between the groups (Figure 3B), while the IgG2 values at day 60 were significantly higher in group 7 (Figure 3C).

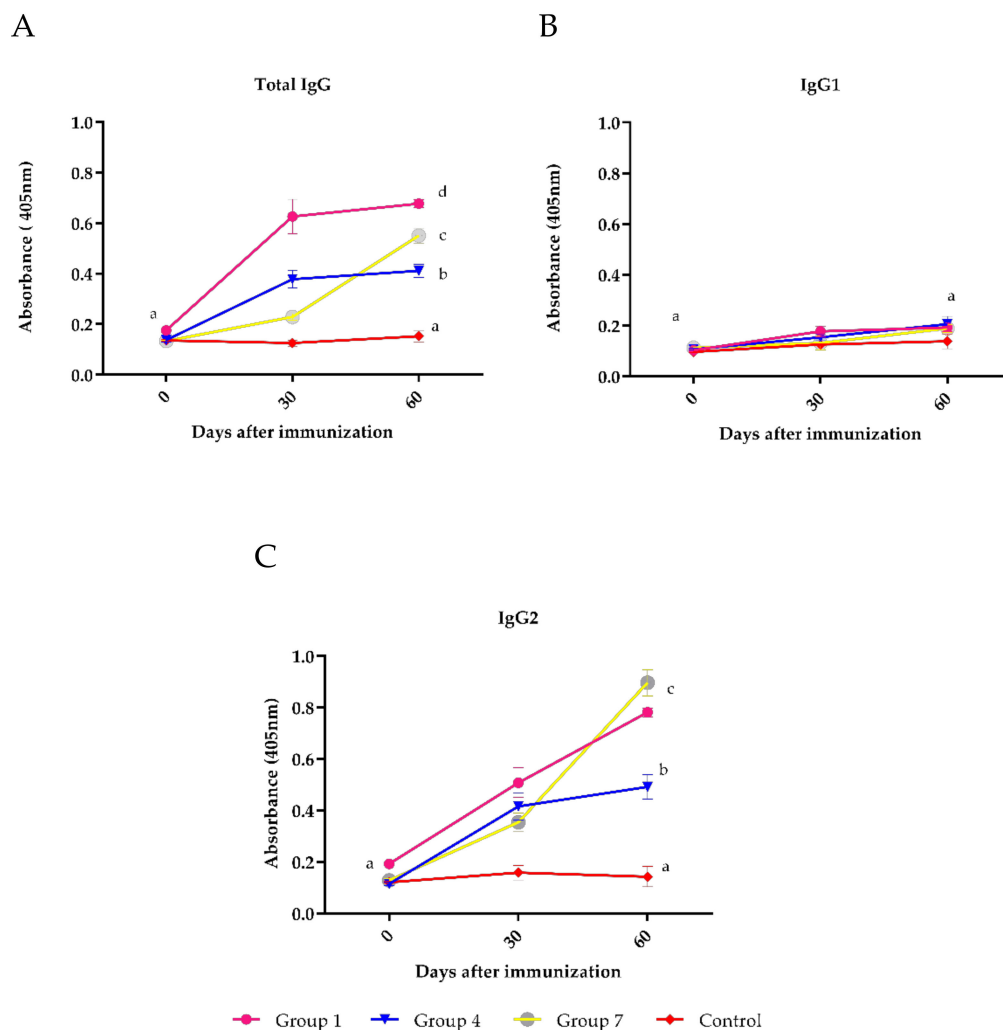


Figure 3. Antibody titers evaluated by ELISA in bovine sera immunized on day 0 with vaccine A and day 30 with vaccine D. Group 1 = vaccine A; group 4 = vaccine D; group 7 = vaccine A + D; and Control group = not vaccinated. Mean titers \pm standard errors (SEM) are shown. Letters (a, b, c and d) highlight significant differences ($p < 0.05$) between groups. **A:** Total IgG antibodies. **B:** IgG1 subclass antibodies. **C:** IgG2 subclass antibodies.

4. Discussion

Uruguay has one of the highest beef and milk production volumes per capita in the world, as well as being one of the largest consumers of beef per inhabitant. Thus, livestock production is not only of economic importance but also is a major part of the diet of the country's population. As such, animal health is a substantial concern for the production chain in the management system regularly employed in Uruguay's cattle farms. At the production level, there is discussion about the efficacy and durability of the response obtained with the available reproductive vaccines, despite the ample number of recognized national and international vaccines available. Here, different protocols have been developed to analyze the antibody response against BoHV-1 using multivalent commercial vaccines in a field herd. It is necessary to clarify that none of the BoHV-1 vaccines tested in this study were monovalent, although the objective here was to evaluate the response of these multivalent vaccines against BoHV-1. In addition, the responses to the Clostridial and FMDV in this study have not been evaluated.

At the international level, vaccines that protect against BoHV-1 are expected to generate at least a neutralizing antibody titer of $\geq 1:8$ [20], although it cannot be ruled out that immunization may still have a protective effect in animals with medium or low antibody titers. It is necessary to clearly define the immune signatures predictive of clinical protection against BoHV-1 in cattle. Variation in responses observed among vaccines may be associated with the lack of specific parameters outlined for their production, inadequate quality control and/or use of inefficient adjuvants. Inappropriate handling and storage are also factors that negatively affect the immunogenicity of vaccines [21]. Here, we use registered vaccines that have been commercially available for many years. Two of these vaccines are manufactured abroad, while the other two are manufactured in Uruguay and exported to various countries. Presumably, the commercial vaccines have undergone rigorous quality controls; however, 3 out of the 4 vaccines evaluated here did not generate satisfactory levels of antibodies to ensure that they would protect against infection in the field with BoHV-1, or we must assume that the protective response is not based exclusively on the production of detectable levels of neutralizing antibodies.

The humoral responses of the vaccines differed from previous studies which detected higher levels of neutralization antibodies against BoHV-1 by SN test [20–22]. In particular, Anziliero et al. [20] found a level of protection against BoHV-1 between 80 and 100% in eight commercial vaccines tested in Brazil. In these studies, the differences found may have been due to the brands of vaccines tested, the control strain used (they used the Cooper strain and we used the Los Angeles strain), as well as the viral incubation neutralization time, which, in our case, was 24 h [19], while they used two hours. Another study showed that SN sensitivity varied greatly depending on the challenge virus used in the test, particularly when results against each virus were considered individually [15]. In addition, there is a difference between the vaccine strains (we have to say which strain the vaccines use) and the Los Angeles samples used in the SN test, which can also influence the detected antibody titer. Thus, the comparison of results with previous studies has to be done with reservations.

Recently, other researchers have analyzed the serological response against BoHV-1 by comparing live vaccines (MLV) and inactivated vaccines [23,24]. The best protective response was observed in heifers vaccinated with live modified thermostable virus [24]. However, in a meta-analysis where the prevention of abortion in cattle following vaccination against BoHV-1 was reviewed, it was found that both MLV and inactivated vaccines decrease abortion risk. Regardless of potential risk, the overall effect of MLV vaccines was a protective effect against abortion [9]. In Uruguay, live vaccines are prohibited and therefore their use in our experiment was not possible.

Additionally, we tested the immunogenicity of vaccine D applied simultaneously with a Clostridial vaccine (Group 5), as well as when applied with an FMD vaccine (Group 6). The practice of applying two or more vaccines simultaneously is widely used in Uruguay and in various countries of the region to optimize the handling of animals. However, there is a lack of field experiments that demonstrate that this practice does not affect the quality of the expected immune response for each immunogen used. Here, it did not generate acceptable levels of protection against BoHV-1 (Table 2), though a significant difference was observed in the IgG titers at day 30 in both groups (5 and 6) compared to the control. This shows that the simultaneous immunization could have affected the initial activation of the immune system (primary response), but then this difference disappeared at day 60. This allows us to assume then that there would be no interference with the response against BoHV-1, at least with the titers of generated antibodies. Despite this, the quality and duration of the humoral and cellular immune response to vaccination should be studied in future experiments.

It is not uncommon for farmers to use a different brand of vaccine for the second dose of the vaccine. Anecdotally, this practice is associated with a higher-quality immune response than applying the same brand in both immunizations. Here, in group 7, we applied vaccine A in the first dose and vaccine D in the second dose. The levels of

protection determined by the neutralizing antibody titers for vaccine A and D were 86% and 20%, respectively, while the combination of brands A + D (group 7) achieved protective titers in 33% of animals (Table 1). Therefore, it was found that the response of vaccine A was affected by changing the brand, while the response of vaccine D was favored in that group.

Most immune responses associated with vaccination are controlled by specific T cells of a CD4+ helper phenotype, which mediate the generation of effector antibodies, cytotoxic T lymphocytes (CTLs), or the activation of innate immune effector cells [25]. Although T helper cells play a central role in the induction of a protective immune response against infections from viral pathogens, Th2 cells producing interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-5 can be detrimental in an infection. Several murine studies firmly established that IL-4 regulates B cells for the secretion of IgG1 antibodies, whereas interferon- γ stimulates the expression of IgG2a antibodies, rendering either isotype an indicator of the underlying Th2 or Th1 response in mice [26]. It has also been shown in cattle that IgG1 expression is positively regulated by IL-4, and IgG2 expression is positively regulated by IFN-gamma [17]. In examining the results of the in-house ELISA employed here, high levels of IgG2 were detected in sera of animals vaccinated with all four vaccines and combinations of vaccines, except vaccine B, where no antibody levels were detected. This significant increase in IgG2 would suggest that a Th1 response profile was activated after vaccination. In addition, we had previously found an IgG2 response in animals naturally infected with BoHV-1 [27], as well as animals vaccinated against BoHV-1; the immune response profile is Th1 with a predominance of IgG2.

In conclusion, our study showed that the four commercial BoHV-1 multivalent vaccines tested produced different antibody levels in cattle after the complete vaccination protocol. Only one vaccine fulfilled the minimum requirements of immunogenicity, conferring adequate neutralizing antibodies in the vaccinated animals. When we evaluate the IgG response, high IgG2 titers were found for all vaccines that had a detectable serological response, indicating a Th1 response profile that is adequate for antiviral response. Taken together, these results demonstrate that the level of neutralizing antibodies alone may not be an adequate parameter for determining protection against BoHV-1. A virus challenge was not carried out in this study and would be an appropriate follow-up study to this work.

Author Contributions: L.D.B., M.L. and A.F. participated in the design of the study, in the experiments and edited the manuscript. F.C. and P.R. helped to interpret the results and edited the manuscript. R.P. participated in the design of the study, in the experiments, interpreted the results and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) of Uruguay, grant number FSSA_X_2014_1_105283.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of Animal Use Ethics Commission (CEUA) from the Facultad de Veterinaria (FVET) at Universidad de la República Oriental del Uruguay (approval number CEUA/FVET-972, Exp. 111900-001057-19).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available on request from the authors.

Acknowledgments: We would like to thank the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) of Uruguay for financing this project and the Universidad de la República del Uruguay (Régimen de Dedicación Total and Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria) for financing this paper. This work was also supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Departamento de Ciência e Tecnologia of Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos of Ministério da Saúde (CNPq/Decit/SCTIE/MS grant number 443215/2019-7). We also wish to acknowledge Scott Brandl for his constructive suggestions and English editing and Gonzalo Suarez for the statistical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Engels, M.; Achermann, M. Pathogenesis of ruminant Herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* **1996**, *54*, 3–15. [CrossRef]
2. International Committee on Taxonomy of Viruses Universal Virus Database [ICTVdB]. Management Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015. Email Ratification 2016 (MSL #30). Available online: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases (accessed on 10 August 2020).
3. Ackermann, M.; Peterhans, E.; Wyler, R. DNA of bovine herpesvirus 1 in trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* **1982**, *4*, 36–40.
4. Muylkens, B.; Thiry, J.; Kirten, P.; Schynts, F.; Thiry, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* **2007**, *38*, 181–209. [CrossRef] [PubMed]
5. Rós, C.; Belák, S. Characterization of glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes* **2002**, *24*, 99–105. [CrossRef] [PubMed]
6. Lemaire, M.; Weynants, V.; Godfroid, J.; Schynts, F.; Meyer, G.; Letesson, J.J.; Thiry, E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 1885–1894. [CrossRef]
7. Guarino, H.; Nuñez, A.; Repiso, M.; Gil, A.; Dargatz, D. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev. Vet. Med.* **2008**, *85*, 34–40. [CrossRef]
8. Alonzo, P.; Puentes, R.; Benavides, U.; Isnardi, F.; García, R.; Piaggio, J.; Cavestany, D.; Roses, G.; Maisonnave, J. Effect of Bovine Herpesvirus 1 infection on pregnancy rate of beef cows in Uruguay. *Veterinaria* **2012**, *48*, 5–12.
9. Newcomer, B.W.; Cofield, L.G.; Walz, P.H.; Givens, M.D. Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *138*, 1–8. [CrossRef]
10. Manoj, S.; Babiuk, L.A.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus-1 glycoprotein D and the amino terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB-specific immune responses. *Virology* **2003**, *313*, 296–307. [CrossRef]
11. Spilki, F.R.; Franco, A.C.; Roehe, P.M. Analysis of isotype-specific antibody responses to bovine herpes viruses 1.1 and 1.2a allows to estimate the stage of infection. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 586–593. [CrossRef]
12. Petzhold, S.; Reckziegel, P.; Prado, J.; Teixeira, J.; Wald, V.; Esteves, P.; Spilki, F.; Roehe, P. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2001**, *38*, 184–187. [CrossRef]
13. Silva, A.D.; Esteves, P.A.; Dezen, D.; Oliveira, A.P.; Spilki, F.R.; Campos, F.S.; Franco, A.C.; Roehe, P.M. Efficacy of a gE-deleted, bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) inactivated vaccine. *Pesq. Vet. Bras.* **2009**, *29*, 545–551. [CrossRef]
14. Campos, F.S.; Dezen, D.; Antunes, D.A.; Santos, H.F.; Arantes, T.S.; Cenci, A.; Gomes, F.; Lima, F.E.; Brito, W.M.; Filho, H.C.; et al. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. *Vet. Microbiol.* **2011**, *148*, 18–26. [CrossRef]
15. Varela, A.P.; Holz, C.L.; Cibulski, S.P.; Teixeira, T.F.; Antunes, D.A.; Franco, A.C.; Roehe, L.R.; Oliveira, M.T.; Campos, F.S.; Dezen, D.; et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet. Microbiol.* **2010**, *142*, 254–260. [CrossRef] [PubMed]
16. Mackenzie-Dyck, S.; Kovacs-Nolan, J.; Snider, M.; Babiuk, L.A.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. Inclusion of the bovine neutrophil beta-defensin 3 with glycoprotein D of bovine herpesvirus-1 in a DNA vaccine modulates immune responses of mice and cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* **2014**, *21*, 463–477. [CrossRef]
17. Estes, D.M.; Brown, W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2002**, *90*, 1–10. [CrossRef]
18. Puentes, R.; De Brun, L.; Algorta, A.; Da Silva, V.; Mansilla, F.; Sacco, G.; Llambí, S.; Capozzo, A.V. Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 119. [CrossRef] [PubMed]
19. OIE, 2020. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Available online: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals> (accessed on 10 November 2020).
20. Anziliero, D.; Martins, M.; Weiss, M.; Monteiro, F.L.; Ataíde, C.F.; Weiblen, R.; Flores, E.F. Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines. *Ciênc. Rural* **2015**, *45*, 58–63. [CrossRef]
21. Silva, L.F.; da Silva, L.F.; Weiblen, R.; Flores, E.F. Immunogenicity of commercial inactivated bovine herpesvirus type 1 vaccines. *Ciênc. Rural* **2007**, *37*, 1471–1474. [CrossRef]
22. Vogel, F.; Flores, E.; Weiblen, R.; Kunrath, C. Neutralizing activity to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) in sera of cattle immunized with vaccines against BHV-1. *Ciênc. Rural* **2002**, *32*, 881–883. [CrossRef]
23. Walz, P.H.; Givens, M.D.; Rodning, S.P.; Riddell, K.P.; Brodersen, B.W.; Scruggs, D.; Grotelueschen, D. Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live viral vaccine. *Vaccine* **2017**, *35*, 1046–1054. [CrossRef] [PubMed]

24. Baccili, C.; Martin, C.; Silva, K.N.; Nichi, M.; Flores, E.; Vercesi Filho, A.; Pituco, E.; Gomes, V. Serological response against bovine herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines in Holstein heifers. *Pesq. Vet. Bras.* **2019**, *39*, 870–878. [[CrossRef](#)]
25. Todryk, S.M. T Cell Memory to Vaccination. *Vaccines* **2018**, *6*, 84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Firacative, C.; Gressler, A.E.; Schubert, K.; Schulze, B.; Müller, U.; Brombacher, F.; von Bergen, M.; Alber, G. Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2681. [[CrossRef](#)]
27. Leites, M.; Puentes, R. Quantification of immunoglobulin isotypes against Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in vaccinated and naturally infected animals. In Proceedings of the XII Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina, 26–28 September 2017.

4.4 Experimento número 4:

“Analizar la respuesta inmune frente a la vacunación contra el virus de la Diarrea viral bovina (BVDV) y el virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en vaquillonas infectadas con el virus de la Leucosis bovina Enzoótica (BLV) y evaluar la performance reproductiva de las mismas.”

Datos aún no publicados

(objetivos específicos 4,5 y 6)

4.4.1 Materiales y métodos del experimento 4

Caracterización del establecimiento y medidas de manejo

El estudio se llevó a cabo en un establecimiento de La Cruz, Departamento de Florida, Uruguay, donde se realiza la recría de terneras de raza Holando de diferentes productores lecheros de la zona. Un lote de ingreso con aproximadamente 8 meses de edad permaneció en el campo en torno a 18 meses, hasta su regreso al productor original con alrededor de 7 meses de gestación. Se llevan registros reproductivos históricos del predio. Es de destacar que el establecimiento no presenta exigencias sanitarias en relación con el ingreso de animales con serología positiva a BLV. Ingresaron al período reproductivo Noviembre-Diciembre de 2019, 562 animales. Cada uno fue identificado, y aproximadamente la mitad de las vaquillonas (n=276) fueron inmunizadas con doble dosis los días - 60 y - 30 pre-servicio, con una vacuna comercial. La misma está aprobada por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) de acuerdo con la normativa nacional vigente en Uruguay y contiene una suspensión inactivada de Herpesvirus Bovino tipo 1 y tipo 5; virus de Diarrea Viral Bovina tipo 1 y tipo 2; *Leptospira interrogans* serovares: Canicola, Grippotyphosa, Hardjo tipo Hardjo-prajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffii, y *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo tipo Hardjo-bovis; *Campylobacter fetus* subsp. Fetus, subsp. venerealis, y subsp. venerealis biotipo intermedius.

Toma de muestras

De cada animal se extrajo sangre de la vena coccígea con y sin anticoagulante (EDTA), los días 0, 30, 60 y 160 post-inmunización. Estas últimas, correctamente rotuladas en tubo seco, fueron coaguladas a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. El suero fue extraído y almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Se contó con la aprobación del protocolo experimental para la utilización de ganado, por parte de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal – UdelaR (CEUA-FVET-972 111900-001057-19).

Conformación de grupos

De un grupo aleatorio de muestras analizadas en el laboratorio (n=217), 113 vaquillonas eran BLV+. De estas, 106 fueron vacunadas con doble dosis los días - 60 y - 30 pre-servicio y el restante utilizadas como control. Por otra parte, 104 (104/217) vaquillonas eran BLV-. De estas, 92 fueron vacunadas y el restante utilizadas como control. Se registró la dentición de cada animal en el ingreso al periodo reproductivo. Se determinó el estatus serológico de los animales contra BLV mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Se utilizaron kits comerciales para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del BLV en suero, con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (IDEXX Leukosis Blocking Test, IDEXX Laboratories).

Hemograma

A fin de conocer aquellos animales BLV con linfocitosis persistente, se realizó hemograma a cada una de las muestras con EDTA, en los primeros tres muestreos. Se utilizó el protocolo descrito por Marshak (1968), considerándose como normales 4000-12000 leucocitos/ μ L y 2500-7500 linfocitos/ μ L (Veterinary Diagnostic Laboratory, Oregon State University).

Detección de anticuerpos neutralizantes mediante seroneutralización *in vitro* contra BoHV-1

Para cuantificar los anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 en los animales inmunizados, se realizó la técnica Seroneutralización *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de la OIE (OIE, 2019).

Las células utilizadas en esta técnica se obtuvieron realizando cultivos de la línea celular MDBK – CRIB (Flores & Donis, 1995) que fueron mantenidas en crecimiento a 37°C en Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco®), , suplementado con suero fetal bovino SFB (Capricorn scientific®) al 10% y antibióticos al 1% (solución de Penicilina/Streptomycin 100x con L-glutamina). Dichas células se incubaron con el medio hasta obtener confluencia celular del 80 a 100%.

Inicialmente se realizó la inactivación del complemento a 56°C durante 30 minutos de cada una de las muestras. Luego en placas estériles de 96 pocillos, se colocaron 50 μ L de cada suero por duplicado y en diluciones crecientes (1:2 hasta 1:256) junto a la misma cantidad del virus conteniendo 100 unidades infectantes (UI) de BoHV-1. En cada placa se utilizaron controles celulares, así como control de virus descarga de 100, 1 y 0 UI. Tras una incubación de 24 horas en estufa a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂, se adicionaron 50 μ L de una suspensión de células CRIB (ajustada a una concentración de 30.000 células/50 μ L en MEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico al 1%). En los siguientes 5 días de incubación y cada 24hs aproximadamente, se evaluó el efecto citopático en cada pocillo, determinándose el

título seroneutralizante para cada uno de los sueros problemas, previa verificación del resultado en los sueros controles empleados en la prueba. Se consideraron como títulos protectores, aquellas muestras cuyo título de anticuerpos neutralizantes fue igual o superior a 1/16 (Pospíšil et al., 1996).

Detección de anticuerpos mediante ELISA contra BoHV-1

Anticuerpos totales

Para la detección de anticuerpos totales anti BoHV-1 se utilizó un kit comercial de ELISA (IDEXX Trachitest Serum Screening Ab Test, IDEXX Laboratories), siguiendo las indicaciones del fabricante. En cada placa sensibilizada con un lisado ultrapurificado del BoHV-1, se colocaron 100µl de los sueros problema diluidos 1:100, al igual que los controles positivos y negativos, tras lo cual se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes se le adicionaron 100µl del conjugado diluido 1:50 (proteína G marcada con peroxidasa), incubándose durante 30 minutos a la misma temperatura. Finalmente, y tras un nuevo lavado, se agregó 100µl del sustrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina o TMB) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz (placas cubiertas). Luego de colocar 100µl de solución de frenado en cada pocillo, se procedió a realizar la lectura a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue proporcional al título de anticuerpos en la muestra y se consideraron positivas aquellas que resultaron por encima del 50%.

Cuantificación de isotipos IgG1 e IgG2

Para detectar los isotipos IgG1 e IgG2, se utilizó un kit de ELISA *in house* indirecto, desarrollado en el laboratorio de Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Uruguay (Leites y Puentes, 2017), utilizando conjugados bovinos comerciales (*Jackson Immuno Research Laboratories* INC).

En placas previamente sensibilizadas con antígeno viral (cepa LA de BoHV-1), se agregaron 50µl de los sueros por duplicado y diluidos 1:2 con solución de dilución rojo fenol. Cada placa presentó sueros controles positivo y negativo, control celular y de antígeno. Se incubó por 1 hora a 37°C. Luego de los lavados correspondientes, se adicionó el conjugado apropiado para cada subclase de IgG, y se realizó una nueva incubación por 1 hora a la misma temperatura. Tras ello se colocaron 50µl de solución TMB en cada pocillo, incubándose por 20 minutos y efectuándose el revelado luego de colocar 50µl de solución de frenado. La lectura de la D.O. se realizó a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Detección de anticuerpos totales mediante ELISA contra BVDV

Utilizando un kit de ELISA comercial (BIO-X Diagnostics, Blocking test for blood sera and plasma), se colocaron tanto los controles positivo y negativo como los sueros en una dilución 1:2, en placas sensibilizadas con la proteína E0 del BVDV. Se incubó

por 2 horas a 37°C y luego de los lavados correspondientes, se colocaron 100µl del conjugado en dilución 1:50 (anticuerpo monoclonal específico contra la proteína E0 del BVDV, adherido a peroxidasa) y se incubó por 30 minutos a la misma temperatura. Posteriormente a un nuevo lavado, se adicionó la solución cromogénica (TMB) y se dejó la placa en un ambiente oscuro por 10 minutos. Finalmente se colocó la solución de frenado y se realizó la lectura de la D.O. a 450nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La intensidad del color fue inversamente proporcional al título de la muestra de suero y se consideraron positivas aquellas muestras con un resultado superior a 50%.

Detección de antígeno contra BVDV

Se utilizó el kit de ELISA comercial (IDEXX Bovine Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus, IDEXX Laboratories), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, en placas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales específicos para la glicoproteína *Erns* de BVDV, se colocaron 50µl de solución de detección en cada pocillo, además de los controles positivo y negativo. Posteriormente se añadieron 50µl de cada muestra, siendo el antígeno capturado por los anticuerpos de la placa. Se incubó a 37°C ± 3°C durante dos horas y se realizaron lavados, tras lo cual se agregaron en cada pocillo 100µl de conjugado, incubándose a la misma temperatura por 30 minutos. Luego de este paso y otro lavado, se agregó 100µl de cromógeno (TMB) a la placa y se incubó protegido de la luz durante 10 minutos. La formación de inmunocomplejos se detectó por la aparición de un color azul y tras añadirse 100µl de solución de frenado se generó un viraje hacia el amarillo. La intensidad del color resultante de la actividad enzimática es proporcional al contenido de elementos patógenos en las muestras. La lectura de la D.O. se efectuó a 450 nm. en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Esta prueba ELISA permitió la detección de animales PI para BVD, y se consideraron como positivas aquellas muestras cuyo coeficiente fue mayor a 0,300.

Es importante mencionar que esta técnica fue efectuada a los días 0 y 30 del ensayo.

Detección del virus BVDV mediante PCR

Se realizó una PCR convencional utilizando protocolos descritos previamente para amplificar la región 5'UTR del genoma de BVDV (amplicón de 207 pb) (Vileck et al 1994, Gaede et al 2005; Hoffman et al 2006, Maya et al., 2016). Los *primers* utilizados BVDV 190Fmod: 5'- GDA GTC GTC ART GGT TCG AC - 3' (Forward), y V326mod 5'- WCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC - 3' (Reverse), enviándose a secuenciar el producto de PCR a MACROGEN-Corea.

Determinación de la carga proviral mediante ddPCR

Se utilizó la técnica *droplets digital* PCR puesta a punto en el Experimento número 1 (Ver Artículo I).

Detección de agentes etiológicos en abortos bovinos

Con el fin de diagnosticar la causa de los abortos ocurridos en el rodeo de estudio, se realizó el diagnóstico de Leptospirosis mediante la técnica de Microaglutinación (MAT), realizada en colaboración por el instituto de Higiene, de la Facultad de Medicina, de BoHV-4 mediante nPCR, estandarizada en el experimento número 2 (Ver Artículo II), de Neosporosis mediante ELISA comercial (IDEXX Neospora caninum Antibody Test Kit y BVD (BIO-X Diagnostics, Blocking test for blood sera and plasma K 283/5) e IBR (IDEXX Trachitest Serum Screening Ab Test, IDEXX Laboratories).

Elaboración de registros y análisis de resultados

Se elaboraron planillas utilizando Microsoft Office Excel, registrándose a cada animal individualmente y los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos. Para comparar el título de anticuerpos obtenidos a las virosis reproductivas entre grupos positivos y negativos a BLV, se realizó una comparación de medias por la prueba t de student con un nivel de significancia del 95 %, utilizando el software Graphpad prism versión 8.4.3 y un análisis de varianza de la media ANOVA

4.4.2. Resultados del experimento 4

Prevalencia serológica de BLV en el rodeo

La prevalencia serológica para BLV al ingreso de las vaquillonas al período reproductivo fue de 63,2% (352/557), con 5,97% (21/352) de animales que al hemograma evidenciaron linfocitosis. Luego de pasados los 160 días, se pudo constatar la seroconversión de 43 animales, llegando a obtenerse una prevalencia de 74,6% (397/532), para lo cual se contemplaron 25 animales que salieron del establecimiento antes de lo previsto. La prevalencia de animales con linfocitosis persistente al final del período reproductivo fue de 5,54% (22/397).

Al final del período reproductivo de las 217 muestras analizadas para la respuesta a la vacunación, seroconvirtieron 26 vaquillonas, las cuales no se utilizaron para el análisis.

Por último, el 76,7% (366/477) de los animales se encontraron dentro de la categoría 2 dientes, mientras que el 19,9% (95/477) eran de la categoría diente de leche y 3,35% (16/477) de la categoría 4 dientes. No existieron diferencias significativas entre la edad (todas vaquillonas) y la condición a BLV ($p=0,421$).

Anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1

Al inicio del experimento, se realizó Seroneutralización *in vitro* a una muestra de 217 animales en cada uno de los sangrados del ensayo (día 0, 30, 60 y 160). De ellos, el 30,4% (66/217) presentó títulos de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 16 al día 0, de los cuales 62 pertenecían al grupo de vaquillonas falladas en el primer período reproductivo del año del establecimiento (Junio-Julio). Los mismos no fueron utilizados al momento de analizar la respuesta a la vacunación.

Con los resultados de BoHV-1 obtenidos al inicio, se conformaron tres subgrupos de animales vacunados: el primero con n=64 BLV+ aleucémicos (BLV+ AL); el segundo con n=6 BLV+ que presentaron LP (BLV+ LP), y por último un grupo con n=40 BLV-. Según se expresa en la Tabla 1, tanto animales BLV- como el BLV+ desarrollaron anticuerpos neutralizantes frente a la primovacunación el día 30, con mayor número de animales que respondieron luego de la segunda vacunación el día 60. El título de anticuerpos protectores luego del tercer sangrado en todos los casos disminuyó hacia el día 160. A pesar de ello, no existieron diferencias significativas entre los subgrupos conformados, en ninguno de los sangrados.

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

Grupo	Día 0	Día 30	Día 60	Día 160
BLV+ AL n=64	#0	#19 1 (16) 6 (32) 6 (64) 4 (128) 2 (256)	#34 16 (16) 13 (32) 3 (64) 2 (128) 0 (256)	#13 12 (16) 0 (32) 1 (64) 0 (128) 0 (256)
BLV+ LP n=6	#0	#2 0 (16) 0 (32) 2 (64) 0 (128) 0 (256)	#3 2 (16) 1 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)	#2 1 (16) 1 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)
BLV- n=40	#0	#11 1 (16) 2 (32) 2 (64) 2 (128) 4 (256)	#25 14 (16) 5 (32) 4 (64) 2 (128) 0 (256)	#11 8 (16) 3 (32) 0 (64) 0 (128) 0 (256)

BLV+ AL (animales positivos al virus de la leucosis bovina, aleucémicos); BLV+ LP (animales positivos al virus de la leucosis bovina, con linfocitosis persistente); BLV- (animales negativos al virus de la leucosis bovina). Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente # Número de animales y entre paréntesis () título de anticuerpos neutralizantes

Anticuerpos totales e isotipos contra BoHV-1

Anticuerpos totales

Para el estudio de la cinética de anticuerpos totales contra BoHV-1 se utilizaron los mismos sub-grupos antes mencionados.

Como se observa en la Figura 1, se evidenció un claro aumento en el título de anticuerpos totales a los 30 (x= 98,23) y 60 (x= 191,8) días post vacunación (dpv), en relación a los animales no vacunados. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,025000$ y $p=0,000002$ respectivamente).

Por su parte, evaluando los subgrupos de animales vacunados por separado (Figura 2), si bien numéricamente aquellos animales BLV- presentaron mayor título de anticuerpos totales contra BoHV-1, con respecto a los BLV+ AL, y BLV+ LP, esta diferencia no fue significativa. De todos modos, hacia los 60 dpv existió una tendencia ($p=0,1$), donde los animales BLV+ LP presentaron menor título de anticuerpos totales. Luego del tercer sangrado, los títulos de anticuerpos totales disminuyeron hacia el día 160, pero de todos modos manteniéndose por encima de los niveles encontrados 30 dpv.

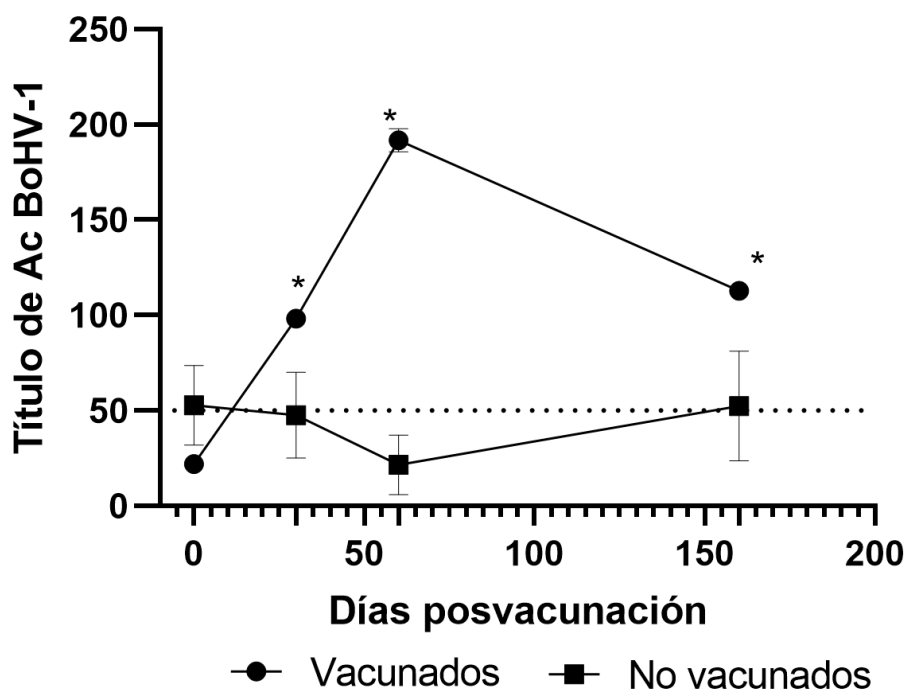


Figura 1 Cinética de anticuerpos totales contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) para animales vacunados y no vacunados, mediante ELISA a lo largo del ensayo. Animales vacunados representados con círculos (n=110); animales no vacunados representados con cuadrados

(n=19). El eje de las ordenadas corresponde al título de anticuerpos contra BoHV-1; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Se representan los errores estándar de los títulos medios. El grupo de animales vacunados recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente *diferencia significativa de $p=0.025$ día 30, $p=0.000002$ día 60 y $p=0.0027$ día 160

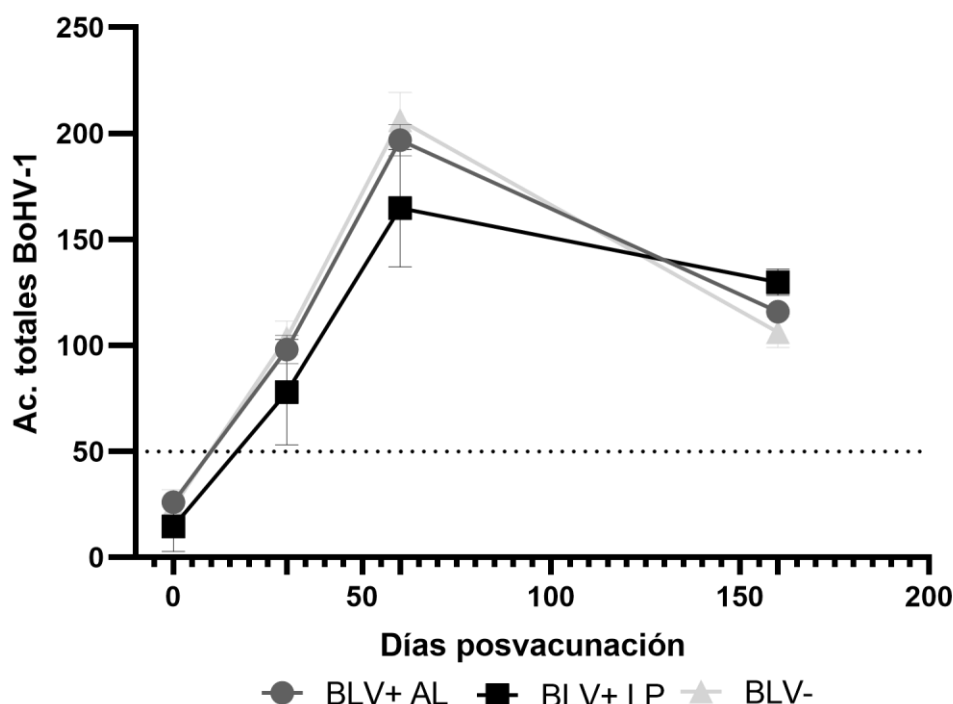


Figura 2 Cinética del título de anticuerpos totales contra *Herpesvirus Bovino tipo 1* (BoHV-1) en animales vacunados y según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo. Animales positivos al virus de la leucosis bovina y aleucémicos (BLV+ AL n=64) en círculos, animales positivos al virus de la leucosis bovina y con linfocitosis persistente (BLV+ LP n=6) en cuadrados, animales negativos al virus de la leucosis bovina (BLV- n=40) en triángulos. El eje de las ordenadas corresponde al título de anticuerpos expresados en porcentaje de inhibición (% inh) contra BoHV-1; el eje de las abscisas corresponde a los días post-vacunación con vacuna comercial. La línea punteada representa el punto de corte para considerar muestras como positivas. Se representan los errores estándar de los títulos medios. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes status a BLV

Isotipos IgG1 e IgG2

Como se expresa en la Figura 3 a), luego de la vacunación los animales BLV+ LP presentaron un aumento en el título del isotipo IgG1 numéricamente mayor que aquellos BLV+ AL y BLV-. Estos valores se mantuvieron consistente durante todos los sangrados posteriores a la inmunización, existiendo una tendencia ($p=0,1$) 30 dpv entre los BLV- ($x=0,38$) y los BLV+ LP ($x=0,51$).

En relación con el isotipo IgG2 (Figura 3 b), el título fue numéricamente mayor en el subgrupo BLV- con respecto al BLV+ (AL/LP), con una tendencia al día 60 luego de la vacunación ($p=0,08$) pero desaparece hacia al 160 dpv.

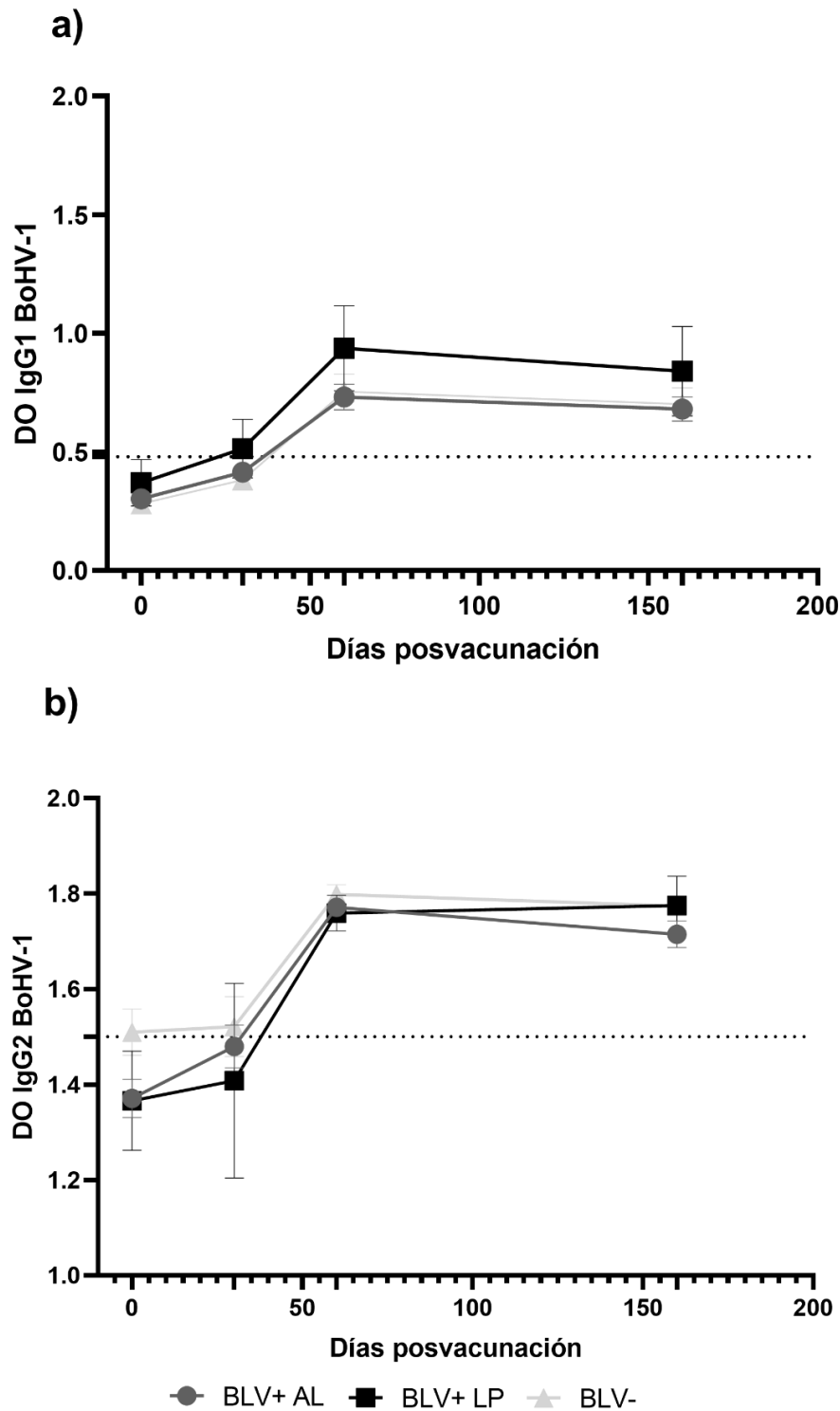


Figura 3 Cinética del título de anticuerpos (isotipos IgG1 e IgG2) contra Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) en animales vacunados y según estado para BLV, mediante ELISA a lo largo del ensayo *Animales positivos al virus de la leucosis bovina y aleucémicos (BLV+ AL n=64)* en círculos, *animales positivos al virus de la leucosis bovina y con linfocitosis persistente (BLV+ LP n=6)* en cuadrados, *animales negativos al virus de la leucosis bovina (BLV- n=40)* en triángulos. a) isotipo IgG1 b) isotipo IgG2. El eje de las ordenadas representa la densidad óptica (DO); el eje de las abscisas representa los días post-vacunación. Se representan los errores estándar de los títulos medios. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente. No se observaron diferencias significativas entre grupos

Anticuerpos totales para BVDV y prevalencia de animales persistentemente infectados en el rodeo

La seroprevalencia al día 0 para el BVDV fue de 97,6% (453/464). A los 11 (11/464) animales seronegativos en el primer sangrado se les realizó el seguimiento en los sangrados posteriores a la vacunación (día 30, 60, 160). En general, se observa que el grupo en estudio (n=11) no respondió a la utilización de la vacuna contra el BVDV y sólo 2 animales presentaron una respuesta numéricamente mayor a 50%. En este sentido no se pudo evidenciar diferencias significativas en la respuesta inmune humoral de animales BLV+ y BLV- para BVDV.

Tras la realización de la técnica ELISA antígeno en dos muestreos (a los días 0 y 160) en el grupo seronegativo, se encontró una prevalencia de 0,2% de animales PI dentro del total en estudio (1/464), confirmado por PCR. Por su parte, mediante su seguimiento durante los sangrados de todo el ensayo, se pudo confirmar que el animal PI tampoco desarrolló respuesta inmune a la vacunación. Paralelamente se realizó en marco de una tesis de maestría de la Unidad de Microbiología, la puesta a punto de la técnica ddPCR para BVD (datos no publicados) donde se cuantificó para el PI de este ensayo, encontrándose las siguientes cargas virales: muestra PI pura 17,4 copias/µl, PI -1: 1,6 copias/µl, PI -2: 0,45 copias/µl y las diluciones -3 a -5: 0 copias/µl. En cuanto al análisis filogenético de esta muestra se determinó que pertenecía a genotipo BVD1.

Agentes etiológicos diagnosticados en los abortos bovinos

Un 2,6% (12/459) de vaquillonas presentaron aborto. Recordamos que las seroprevalencias iniciales en el rodeo fueron de 63,2% para Leucosis Bovina, 97,6% para Diarrea viral bovina y 22,5% para la Rinotraqueítis infecciosa Bovina. Se encontró una relación significativa ($Pr=0,027$) entre la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en vacas que abortaron. El 67% (8/12) de las vaquillonas abortadas eran seropositivas a neosporosis, mientras que de los 7 animales control solo 1 era seropositivo a neosporosis (14,2%).

Por otro lado se estudió la seroprevalencia a Neosporosis al día 0 siendo de 33% (84/248) y día 160 de 31,7% (108/340). En cuanto a Leptospirosis, se destaca la reactividad alta de anticuerpos (1/200-1/1600) contra el serogrupo *Ballum cepa Castellonis* en las vacas abortadas (9/12), siendo éste predominante en 6 de las 9 vacas abortadas ($Pr=0.003$). Se evidencia una elevada presencia de BoHV-4 tanto en abortadas (11/12) como en controles (7/7), aunque los mayores títulos de anticuerpos se encontraron en 3 animales de los abortados.

Performance reproductiva de las vaquillonas

La preñez general del rodeo fue de 89,7% (412/459), superando la media histórica desde el 2002-2019, de un 82% de preñez (Figura 4).

La preñez del grupo BLV+ fue de 90,5% y 89,7% del grupo BLV negativo. El grupo vacunado con una vacuna comercial reproductiva polivalente fue de 237 vaquillonas y la preñez fue de 88,2%, mientras que el grupo no vacunado de 222 vaquillonas presentó una preñez de 90,8%. No se encontraron diferencias significativas entre la seropositividad a BLV y la vacunación con los porcentajes de preñez.

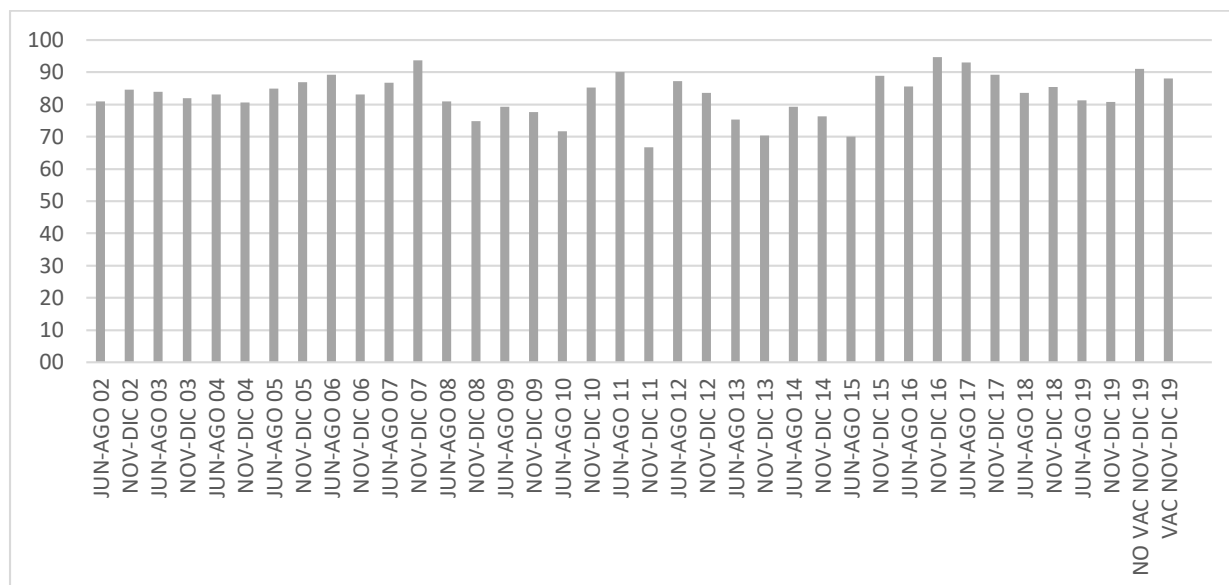


Figura 4 Porcentaje de preñez histórico desde 2002 a 2019. Se diferencia en el periodo de estudio entre animales vacunados y no vacunados con vacuna reproductiva polivalente.

Carga proviral y respuesta inmune de las vaquillonas contra BoHV-1

Se realizó mediante ddPCR la cuantificación absoluta de la carga proviral de BLV a 56 vaquillonas el día 0 y el día 160 del estudio. Se constató que el 35% fueron catalogados de baja carga proviral, 30% de animales con alta carga proviral y 35% de animales que cambiaron en el periodo de 6 meses su categorización de carga proviral, de ellos el 30% aumento su carga viral de baja a alta carga proviral y 2 animales el cambio fue inverso de alta carga a baja carga proviral.

En cuanto a la respuesta inmune de los animales frente a la vacunación de BoHV-1, se encontraron diferencias significativas entre el grupo que cambia la carga proviral (L-HPL) al día 60 y 160 posvacunación con respecto al grupo de baja carga proviral, presentando el grupo L-HPL mayores títulos de IgG1 ($p=0.02$ en ambos días). En cuanto a la respuesta del isotipo IgG2 el grupo de alta carga proviral (HLP) se diferencia del grupo L-HPL pero de forma la inversa, presentando estos últimos los menores títulos de IgG2 los días 30 y 160 posvacunación.

En cuanto al porcentaje de preñez por carga proviral no se encontraron diferencias significativas.

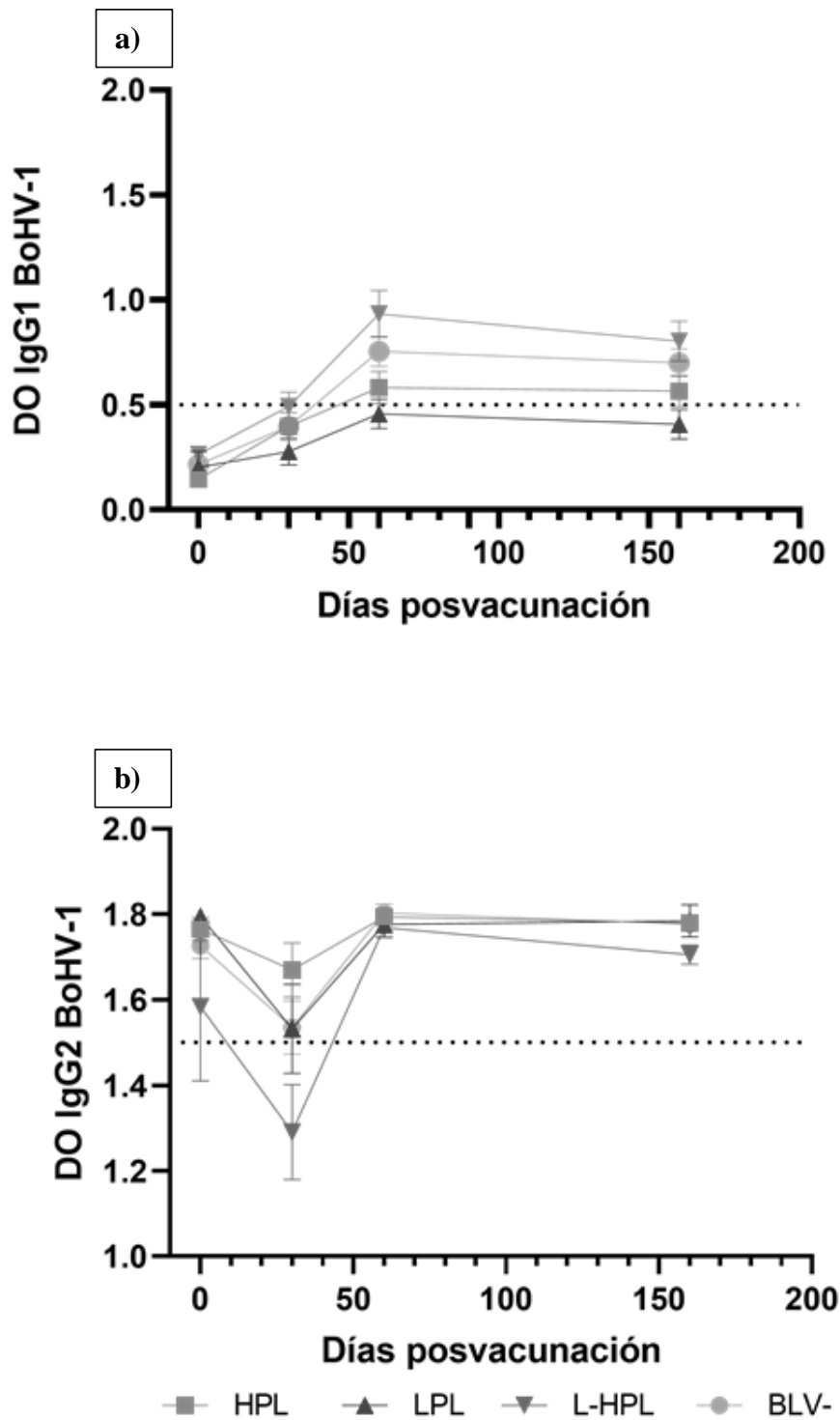


Figura 5 Cinética del título de anticuerpos (isotipos IgG1 e IgG2) contra *Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1)* en animales vacunados y según carga proviral para BLV, mediante ddPCR a lo largo del ensayo. Animales positivos al virus de la leucosis bovina de alta carga proviral (HPL) (n=16) en cuadrados, animales positivos al virus de la leucosis bovina y con baja carga proviral (LPL) (n=10) en triángulos vértice hacia arriba, animales positivos al virus de la leucosis bovina que cambian su carga proviral de baja a alta carga proviral (LHPL) (n=10) en triángulos vértice hacia abajo, animales negativos al virus de la leucosis bovina (BLV-) (n=41) en círculos. a) isotipo IgG1 b) isotipo IgG2. El eje de las ordenadas representa la densidad óptica (DO); el eje de las abscisas representa los días post-vacunación. Se representan los errores estándar de los títulos medios. Todos los animales recibieron doble dosis de vacuna comercial polivalente.

4.4.3 Discusión del experimento 4

El BLV es la principal virosis que afecta a los rodeos lecheros en nuestro país. El 90% de los animales infectados son asintomáticos (60% aleucémicos y 30% con LP), produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la limitación en la exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad de los animales y disfunciones importantes en su sistema inmune (Bartlett et al., 2013; Bartlett et al., 2014). Es conocido que la infección por este retrovirus genera disturbios a nivel de la inmunidad humoral y celular (Kabeya et al., 2001; Gillet et al., 2007; Frie & Coussens, 2015; Blagitz et al., 2017), desconociéndose hasta el momento el impacto económico que ello supone. Se ha determinado que existe un incremento muy importante en la población de linfocitos B, con disminución en los porcentajes tanto de linfocitos T CD4+ como T CD8+ (Sordillo et al., 1994; Nieto Farias et al., 2018). A pesar de que el linfosarcoma ocurra en una proporción pequeña del ganado infectado con BLV, el virus puede tener efectos más sutiles sobre la salud del rodeo, incluso teniendo impacto sobre los programas de vacunación (Erskine et al., 2011; Puentes, et al., 2016a; Frie et al., 2016). Vinculado a ello, en este estudio se buscó determinar si las vaquillonas BLV- y BLV+ eran capaces de generar una respuesta inmune diferencial frente a la administración de una vacuna comercial contra BoHV-1 y BVDV, ambos patógenos virales ampliamente distribuidos, y con gran impacto reproductivo en la producción lechera a nivel local y mundial (Houe, 1999; Muylkens et al., 2007; Guarino et al., 2008; Richter et al., 2017).

La prevalencia serológica contra BLV al ingreso de los animales al período reproductivo fue de 63,2% y 74,6% al finalizar el ensayo (6 meses). Estos resultados fueron algo superiores en relación a estudios previos realizados en Uruguay, donde en 2013-2014 se encontró una seroprevalencia de 45% en el mismo sistema de cría de ganado lechero y bajo las mismas condiciones del presente trabajo, y 52,7% luego de los períodos reproductivos (18 meses) (Puentes, et al., 2016b) y similares a los resultados obtenidos en 2015 en un estudio representativo de toda la cuenca lechera del país, donde la prevalencia serológica media para BLV fue de 78,8% (Riet Correa et al., 2019). A pesar de ello, en el presente ensayo la mayoría de los animales eran jóvenes, siendo el 76,7% categoría dos dientes, mientras que en el trabajo antes mencionado se trataba de animales en producción. En tanto, es importante destacar que el hecho de tener altas prevalencias en el rodeo condiciona a la aparición de la infección a más temprana edad (Gutiérrez et al., 2011; Ruiz et al., 2018) lo que se puede asociar a los resultados encontrados en este ensayo.

Por su parte, el porcentaje de animales con LP rondó valores cercanos al 6%, lo cual es llamativo, teniendo en cuenta que en general, al tratarse de una infección crónica, se requiere de largos períodos de latencia antes de llegar a dicha fase. En este sentido Gutiérrez et al. (2014), trabajaron con animales en su etapa perinatal (hasta los 36 meses), al igual que en el presente trabajo, y establecieron que tras el contagio ya sea pre o postnatal, el rápido aumento de la carga proviral es indicativo de que la respuesta inmune, aún en desarrollo de los animales, no detiene la replicación del BLV. Algunas citoquinas que regulan la expresión del virus y retrasan la progresión a LP en adultos, incluidos el IFN γ e IL-2, son deficientemente expresados en animales jóvenes. A su vez, la alta carga proviral en las madres de estos animales podría relacionarse con la alta probabilidad de infección de sus terneros (Gutiérrez et al., 2014). Los animales jóvenes son los que más se movilizan y por lo tanto pueden desempeñar un papel

activo en la diseminación del BLV. A pesar de que en el establecimiento de esta investigación se aplicaron buenas prácticas de higiene en los diferentes procedimientos, desinfectando instrumental quirúrgico, cortantes y agujas, es igual de importante la identificación temprana de vaquillonas con LP para su posterior eliminación. En efecto, en un estudio realizado por Juliarena et al. (2007), se pudo establecer que animales con LP presentan consistentemente alta carga proviral en leucocitos de sangre periférica (clasificados como HPL). Se trata de animales con gran capacidad propagadora del virus y su correcto manejo permitiría disminuir la prevalencia de BLV en los rodeos lecheros de nuestro país (Juliarena et al., 2016).

El BoHV-1 es la principal causa de abortos de etiología viral en bovinos a nivel mundial, produciendo grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Muylkens et al., 2007). En Uruguay, la infección con este virus se encuentra ampliamente distribuida. En el presente estudio, la prueba de Seroneutralización *in vitro* (técnica de referencia por la OIE) reveló la presencia de anticuerpos neutralizantes en el 30,4% (66/217) de los animales estudiados, al inicio del ensayo. Según un trabajo realizado por Repiso et al. (2005), la prevalencia serológica general fue de 36,6%, mientras que Guarino et al. (2008) encontró seroprevalencias de 45%. Asimismo, es importante destacar que de las 66 vaquillonas inicialmente seropositivas contra el BoHV-1, 62 (94%) pertenecían al grupo de animales fallados en el primer período reproductivo del año del establecimiento (Junio-Julio 2019). En este sentido es posible sugerir que, sabiendo que previamente los animales no habían sido vacunados, la causa de infertilidad podría estar asociada a la exposición natural al BoHV-1, ya que es conocida su capacidad de provocar muertes embrionarias con retorno al celo, como consecuencia de la infección del tracto respiratorio o genital (Miller et al., 1991; Alonzo et al., 2012). En este sentido, Alonzo et al., (2012) en su trabajo realizado en Uruguay, concluyeron que el porcentaje de preñez en su diagnóstico a los 52 días, en un grupo de animales con infección aguda fue menor que el grupo control (33% y 86%, respectivamente), lo cual determinó un retraso en la preñez de los animales infectados con el virus.

Si se considera el grupo de animales sin anticuerpos neutralizantes al comienzo del ensayo, e independientemente del estatus para BLV, la doble dosis de inmunización aplicada, según demuestran los resultados obtenidos, generó una seroconversión en 56% de las vaquillonas (62/110), con títulos aceptables para estar protegidos (igual o superior a 1/16) (Pospíšil y col., 1996). Se observó una media en los títulos de anticuerpos de $\bar{x} = 98.23$ y $\bar{x} = 191.8$, 30 y 60 dpv respectivamente, demostrándose diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo control no vacunado. En un estudio realizado por Silva et al. (2007), de las seis vacunas comerciales contra el BoHV-1 testeadas, dos de ellas de origen uruguayo, generaron títulos de anticuerpos neutralizantes compatibles en todos los animales (títulos $> 1/2$), pero cuando consideramos anticuerpos protectores títulos iguales o superiores a 1/16, como en nuestro estudio, se reduce la respuesta a 67% (6/9) en una de las vacunas y 18% (2/9) en la otra. Mientras que si consideramos en nuestro ensayo títulos 1/2 los porcentajes de animales positivos son 66% y 94% al día 30 y 60 respectivamente, simulando la vacuna utilizada con los trabajos anteriores. Anziliero et al. (2014), en sus estudios concluyeron que a excepción de dos vacunas que indujeron seroconversión en 8/10 y 9/10 animales, los demás productos utilizados generaron anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 en todos los animales vacunados, con títulos protectores aceptables. Así pues, concluyeron que la inmunogenicidad de la mayoría de las vacunas comerciales utilizadas fue aceptable y, probablemente, suficiente para lograr la inmunización adecuada de los rebaños. Del mismo modo, Newcomer et al. (2017b), describen que la vacunación (tanto con vacunas virales vivas modificadas como

inactivadas) contra el BoHV-1 disminuyó el riesgo de aborto en un 60%, confirmando el beneficio de incluir este método como un componente más en el programa de salud en los establecimientos.

En este contexto, en el presente ensayo es relevante mencionar la importancia de la activación primaria del sistema inmune generada 30 dpv, tras la dosis vacunal inicial. Con ello, luego de la segunda inmunización, los títulos de anticuerpos alcanzados fueron aún mayores, lo cual permitiría a los animales desencadenar una respuesta inmunitaria rápida y eficaz tras la posible re-exposición al BoHV-1. Aunado a ello, si bien luego del día 60 los títulos de anticuerpos totales disminuyen, no lo hacen por debajo del límite de protección aceptable, al menos hasta el sangrado al día 160. Si bien no se conoce la dinámica luego de dicho momento, no podemos descartar que efectivamente se genere una meseta en la respuesta inmunológica a la vacuna, lo cual sería deseable para mantener la protección. En este sentido podría haber sido necesario, realizar un sangrado posterior.

A pesar de la respuesta satisfactoria a la vacunación en todos los casos, no existieron diferencias significativas entre los subgrupos BLV+ AL, BLV+ LP y BLV-, tanto para anticuerpos neutralizantes como totales, en ninguno de los sangrados. Si bien no fue posible establecer una asociación estadística entre la condición a BLV y la respuesta inmune humoral generada por la vacuna, se registró una tendencia hacia los 60 dpv ($p=0,1$), donde animales BLV+ LP presentaron menor título de anticuerpos totales. Al respecto, ha sido comprobado que el ganado infectado con BLV genera una respuesta de anticuerpos defectuosa a desafíos específicos, con mecanismos de supresión inmunológica que afectan tanto la vía humoral como la celular (Sordillo et al., 1994; Frie et al. 2016).

Sin embargo, como ha sido comprobado previamente por nuestro grupo de trabajo, para otro virus, el virus de la Fiebre Aftosa (Puentes, et al., 2016a), si bien no se observan diferencias a nivel de anticuerpos totales, si se aprecian en el perfil específico de respuesta a la vacunación. En tal sentido es importante mencionar que la inducción de isotipos específicos favorece el desarrollo de mecanismos efectores y, junto a la inmunidad celular, es importante en la respuesta a la vacunación. Se ha determinado que la vacunación contra el BoHV-1 genera un incremento en los títulos de IgG1 e IgG2, estableciéndose que valores de la relación IgG2/IgG1 mayores a 1 se asocian con mayores niveles de protección frente al desafío posterior con el virus (Romera, 2001). Según los datos obtenidos en el presente estudio, la relación IgG2/IgG1 se mantuvo en todos los sangrados por encima a 1. De este modo, evaluando la respuesta diferencial de isotipos, el subgrupo BLV+ LP presentó un aumento en el título del isotipo IgG1 numéricamente mayor que los animales BLV+ AL y BLV-, existiendo una tendencia al día 30 ($p=0,1$). Vinculado a dichos resultados, es posible referir a estudios que han demostrado que las alternancias en la expresión de citoquinas se correlacionan y pueden contribuir con la progresión de la enfermedad en infecciones retrovirales crónicas (Kabeya et al., 2001). Así, según Pyeon & Splitter (1998), animales BLV+ en las primeras etapas de la infección (AL) desarrollan una respuesta celular mediada principalmente por linfocitos T helper 1 (Th1), productores de IL-2, IL-12 e IFN- γ ; pero tras la progresión de la enfermedad, junto con la LP, se producen cambios en el perfil de células T. En efecto, la respuesta se modifica por linfocitos T helper 2 (Th2), productores de IL10 e IL-4 (Sordillo et al., 1994; Kabeya et al., 2001; Konnai et al., 2017). Asociado a ello, también se ha demostrado que la expresión de IgG1 está regulada positivamente por IL-4, mientras que la expresión de IgG2 está regulada positivamente por el IFN- γ (Estes & Brown, 2002). Por lo tanto, a

pesar de no encontrar evidencia estadística de que el subgrupo BLV+ LP produjo mayor título de IgG1 que el BLV-, si existe una tendencia a los 30 dpv, que podría responder al cambio hacia una respuesta Th2, con disminución de la expresión de citoquinas tipo 1 y aumento de IL4, lo cual favorece la producción de IgG1 por los animales con LP. La ausencia de diferencias significativas podría verse argumentada por el limitado número de animales LP (n=6). Según Romera (2001), la mayor respuesta de IgG2 en animales vacunados contra BoHV-1 se logra recién tras una segunda revacunación. Es así que, en el presente ensayo solo se aplicaron dos dosis de vacuna comercial, obteniéndose datos hasta el día 160, por lo cual el hallazgo de mayores cantidades de IgG1 sería consistente con lo antes mencionado.

En relación con el isotipo IgG2, se encontró que el título fue numéricamente mayor en el subgrupo BLV- con respecto al BLV+ (AL/LP), con una tendencia a su favor, al día 60 luego de la vacunación (p=0,08). Esto es consistente con el estudio realizado por Erskine et al. (2011), en el cual el ganado libre de BLV y vacunado contra la bacteria J5 de *E.coli* se produjo una cantidad significativamente mayor de IgG2 sérica específica de antígeno, en comparación los animales infectados con el retrovirus. Más recientemente en el trabajo realizado por Frie et al. (2016), tras la vacunación contra BoHV-1, los bovinos BLV+ produjeron menores títulos de anticuerpos, particularmente IgG2 contra dicho virus, en comparación con el ganado libre de BLV. A su vez, los niveles altos de IgG2 pueden explicar por qué no existieron diferencias significativas en el análisis de los títulos de anticuerpos totales.

Junto al BoHV-1, el BVDV es otro de los patógenos que tienen gran impacto a nivel reproductivo en Uruguay, asociado a enfermedades y mortalidad en la industria ganadera. Recientemente Maya et al. (2016), encontraron que el 100% de los rodeos de su ensayo eran seropositivos, revelándose que BVDV-1 (BVDV-1a, BVDV-1i) es el genotipo encontrado con mayor frecuencia en el país, seguido por BVDV-2 (BVDV-2b). En el presente trabajo se obtuvo una seroprevalencia contra BVDV de 97,6%, y esta alta proporción de animales seropositivos se puede asociar a una exposición directa al virus, dada probablemente por la presencia de animales PI en el grupo en estudio. El mismo representó el 0,2% de rodeo, encontrándose dentro de los valores esperados para la prevalencia de animales PI, donde según Newcomer et al. (2017a), pueden llegar a ser menores al 1%. La identificación y eliminación de estos bovinos es esencial en los planes de control contra la BVD, pues significan una fuente de infección muy importante para la perpetuación del virus en el rodeo, eliminando entre 1 y 10 millones de partículas virales infecciosas por mililitro de fluido corporal por día (Hanon et al., 2014; Moennig & Becher, 2018; Gates et al., 2019). Se destaca en esta tesis, el bajo número de copias virales encontradas en esta vaquillona persistentemente infectada del rodeo y gestación normal. Otros autores realizaron la prueba de RT-PCR en tiempo real de cuatro sueros PI y la amplificación fue de un producto específico del genotipo 1 con valores Ct (Ciclo *threshold* o ciclo umbral) de 32,36, 36,29, 37,14 y 34,92 para cada muestra frente al control positivo del genotipo 1 con un Ct de 15,14, (Valdez et al., 2018) sugiriendo bajas cargas virales en animales PI.

La recomendación en este caso, en base al éxito de planes nacionales obligatorios en países donde BVD es endémica (Moennig et al., 2005; Houe et al., 2006; Presi et al., 2011), es la eliminación del animal PI. En este sentido es interesante mencionar la estrategia del programa nacional irlandés de erradicación de BVD, donde ha sido obligatorio para todos los terneros recién nacidos el análisis mediante el llamado “modelo suizo” de antígeno en tejido (método directo). Con ello, tras su identificación

y eliminación, se logró disminuir sustancialmente la incidencia de animales PI (Thulke et al., 2018). Actualmente en Uruguay, dentro de los métodos de control para la BVD se aplica de forma voluntaria, pero sería conveniente poder implementar un marco legal para su obligatoriedad, pudiéndose establecer así un manejo eficaz de la enfermedad. Para tal efecto sería útil una investigación previa en relación con la prevalencia nacional de animales PI, así como de las capacidades económico/humanas para llevar a cabo el control por las vías mencionadas.

En paralelo, otro de los métodos mundialmente utilizados en el control de BVD es la vacunación. En la actualidad, tanto vacunas vivas modificadas como inactivadas se encuentran disponibles contra el BVDV, a menudo combinadas con otros agentes virales y/o bacterianos, como es el caso de la vacuna utilizada en el presente ensayo. La vacunación del ganado en edad reproductiva, manejo aplicado en esta investigación, previene la incidencia de abortos, así como la viremia y consecuente transmisión transplacentaria, que puede derivar en el nacimiento de crías PI. Esto último, si bien se considera uno de los objetivos más importantes de la vacunación, es más difícil de lograr que la prevención de la enfermedad clínica (Newcomer et al., 2017a).

En este contexto, la eficacia vacunal cobra vital importancia en los sistemas productivos. En efecto, los resultados del presente estudio indican una ausencia de respuesta a la inmunización contra el BVDV. De manera similar, en un trabajo donde se evaluó la respuesta serológica contra el BVDV inducida por vacunas comerciales del mercado brasileiro, Anziliero y col. (2014) demostraron que cuatro vacunas no indujeron respuesta serológica neutralizante contra BVDV-1 en ningún animal, y una de ellas sólo en un animal (9%). Por su parte, cinco vacunas no indujeron anticuerpos contra BVDV-2 en ningún animal, y una de las mismas sólo en dos animales (20%). Más recientemente, en un trabajo publicado por Merchioratto et al., (2020), se evaluaron las respuestas serológicas inducidas por cuatro vacunas comerciales inactivadas de origen uruguayo en ovinos, y solo una de ellas demostró producir títulos de anticuerpos neutralizantes moderados contra BVDV-1 y -2. En virtud de ello, se puede constatar que la variabilidad del virus y la existencia de tipos antigénicos distintos (Ridpath, 2005; Evans et al., 2019) con deficiente nivel de reactividad cruzada, significan uno de los obstáculos para el éxito en los planes de vacunación. Si bien el uso de vacunas monovalentes genera la producción de anticuerpos neutralizantes a antígenos virales heterólogos, como pudieron demostrarlo Kelling et al., (2007), generalmente la protección homóloga es superior (Van Campen et al., 2000; Fulton et al., 2003). En un estudio realizado por Sozzi et al., (2020), se confirmó una mínima reacción cruzada entre los subgenotipos 1a y 1b del BVDV. En Uruguay las vacunas más utilizadas acusan tener ambas cepas, sin especificar subgenotipos. Por lo tanto, la elección de una vacuna debería basarse en estos aspectos epidemiológicos, para lograr quizás mejores resultados. En efecto, la aplicación de vacunas polivalentes, involucrando tanto diferentes genotipos como subgenotipos, sería de utilidad (Newcomer, et al., 2017a). En un meta-análisis llevado a cabo por Newcomer et al., (2015), se llegó a concluir que vacunas polivalentes demostraron ser más eficaces en la protección contra la infección fetal y la prevención del aborto, en comparación con aquellas monovalentes. Por lo tanto, este tipo de productos son más recomendables a fin de proporcionar máxima cobertura contra una potencial variedad de cepas de desafío.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta al momento de evaluar la respuesta a la vacunación es si se trata de productos inactivados o a virus vivo modificado. En el presente estudio se utilizó una vacuna inactivada, conteniendo antígeno viral incapaz

de replicarse. Ello condujo invariablemente a que se redujeran los riesgos adversos asociados a la vacunación, pero también se vio limitada la capacidad inmunógena de la vacuna, produciéndose anticuerpos dirigidos principalmente a proteínas estructurales, como E2. Si bien esto se pudo ver compensado, como lo fue realizado en esta investigación, con la aplicación de una doble dosis (al día 0 y un *booster* al día 30), de todos modos no se alcanzaron los niveles de anticuerpos protectores en el lote en estudio. Una alternativa a esta problemática podría ser la utilización de vacunas a virus vivo modificado, que son capaces de estimular más rápidamente la producción de niveles más altos de anticuerpos, al igual que la inmunidad mediada por células. Esto ha sido comprobado por diversos autores, como Brock et al., (2007), quienes determinaron que la protección estuvo presente tan pronto como 5 días luego de la vacunación con una única dosis contra BVDV-2 de vacuna viva modificada. De todos modos, debiera tenerse en cuenta que estos productos son menos seguros al momento de evitar la infección y sus consecuencias reproductivas en hembras gestantes. Se trata vacunas que simulan de mejor manera una infección natural, generando la producción de anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales del BVDV, expresadas durante la replicación en células infectadas. Las proteínas no estructurales se asocian a regiones altamente conservadas en los diferentes genotipos de BVDV, lo cual representaría una ventaja frente a la variabilidad de estos virus. A pesar de sus beneficios, las vacunas a virus vivo modificado aún no se encuentran autorizadas para su uso en Uruguay.

Debido a los resultados presentados en esta tesis doctoral, se puede afirmar que la vacuna utilizada no generó una respuesta serológica con la magnitud deseada en el lote de animales estudiado, mediante la prueba de ELISA. En efecto, es importante revisar de manera periódica las formulaciones y composición de los productos comerciales que se utilizan contra el BVDV. Esta carencia de respuesta puede estar dada por la falta de parámetros específicos para la producción de vacunas en Uruguay, si se tiene en cuenta que los factores de manipulación y almacenamiento fueron adecuados al momento de la vacunación. La concentración de antígeno y adyuvante pueden afectar directamente la respuesta inmune en lo bovinos y probablemente sean las fallas principales en la formulación de vacunas (Anziliero et al., 2014; da Silva et al., 2007)

Por otra parte, es interesante mencionar que en virtud de los resultados obtenidos con respecto a la seroprevalencia por un lado (animales seropositivos contra BVDV al inicio del ensayo, aun cuando el rodeo se declaró sin vacunación), y por el otro, a la respuesta a la vacunación (grupo de animales libres de BVDV al inicio del ensayo, no respondió a la misma), no fue posible determinar si existen diferencias en la respuesta inmune generada en vaquillonas BLV+ con respecto a las BLV-. Es necesario continuar investigando al respecto, asegurando animales negativos al BVDV al inicio de los ensayos, a pesar de que la experiencia en nuestro grupo de trabajo, significa una dificultad en Uruguay encontrar rodeos libres de esta infección. Otra alternativa a ello podría ser la utilización durante el ensayo, de técnicas diagnósticas capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos generados en infecciones naturales.

En cuanto al grupo de animales seronegativos al inicio del ensayo (2,4%) a BVDV, se trata de bovinos que, si bien no presentaron infección natural, más allá de la presencia de un animal PI en el rodeo, tampoco respondieron a la vacunación. Ello nos permite cuestionarnos si existe alguna condición propia que los hiciera resistentes a la infección contra el BVDV. Al respecto, se conoce que la glicoproteína de membrana CD46 es utilizada por el BVDV como plataforma para la unión a células

bovinas (Maurer et al., 2004) y está demostrada la variabilidad del ligando específico de dicha glucoproteína para el virus (llamado CCP1), existiendo versiones alélicas con unión significativamente menor al BVDV (Zezafoun et al., 2011). En este sentido, según Alzamel et al., (2016), la versión soluble de CD46 (sCD46), presumiblemente tiene capacidad de inhibir la unión al BVDV, lo que sugiere que el ganado naturalmente podría controlar de manera parcial la propagación hematogena del virus. La concentración de sCD46 en suero podría afectar la resistencia o susceptibilidad de un animal individual a la enfermedad asociada con la infección por el BVDV.

En cuanto a los hallazgos encontrados en los abortos en el periodo de estudio, se puede concluir que la serología positiva a *Neospora caninum* se encuentra asociada significativamente a los abortos en este rodeo, si bien se evidencia que existe circulación tanto de enfermedades virales como bacterianas, que pueden estar interactuando en los resultados. El porcentaje de abortos de este rodeo fue inferior al promedio reportado en una encuesta nacional del 4,4% (Suanes et al., 2021). Variedad de estudios han determinado que la principal causa de aborto bovino en Uruguay es la Neosporosis (Easton C., 2006; Da Silva Silveira, 2019; Macias-Rioseco M., 2019). *Neospora caninum* ha sido identificado mundialmente como una de las principales causas de aborto en bovinos (Koutsodontis et al., 2017; Lindsay & Dubey, 2020). Actualmente, en bovinos de leche se determinó prevalencias prediales de 21,5% e individuales de 96% (Macchi et al., 2020). Por otro lado, en cuanto a Leptospirosis, la creciente importancia en los casos humanos del serovar Ballum, un serotipo asociado con la vida silvestre, sugiere que la vida silvestre puede ser una fuente de infección pasada por alto y el ganado también podría actuar como puente para los humanos (Moinet et al., 2021). Los ratones son el principal huésped de mantenimiento de este serovar y, otras especies, como los erizos, las ratas de barco y las ratas marrones, también pueden mantener a Ballum. Se desconoce la patogenicidad de la *Leptospira borgpetersenii* Ballum Castellonis en la especie bovina y la epidemiología de esta en relación a la infección en humanos. En este trabajo se encontró en un alto porcentaje de esta serovariedad en las vacas abortadas, siendo que no se encuentra disponible en las vacunas utilizadas en nuestro país. Más estudios se deben realizar para identificar la relevancia de este patógeno. Finalmente, se cree que la disminución de la incidencia de casos en humanos de Hardjobovis y Pomona está influenciada por la implementación de la vacunación en las industrias láctea y porcina con estas serovariedades (Marshall & Cheresky, 1996).

Los datos recientes indican que los niveles de carga proviral en sangre entera (PVL) en vacas infectadas con BLV podrían ser un indicador de la progresión de la enfermedad en el campo (Kobayashi et al., 2020). Estudios transversales previos informaron que los niveles de PVL en sangre entera de ganado con linfocitosis persistente eran significativamente más altos que los del ganado asintomático infectado con BLV (Panei et al., 2013). Sin embargo, el ganado asintomático infectado con BLV exhibió un rango muy amplio de niveles de PVL (Panei et al., 2013). En esta tesis y en relación a la carga proviral de BLV, se observó un aumento de la misma luego de 160 días de experimento. Se ha observado en otros estudios que no hay diferencias en la carga proviral cuando comparan vaquillonas y ganado adulto, y que 9,8% de las vaquillonas previo al primer parto presentan alta carga proviral (Merlini et al., 2016), porcentaje de animales superado en esta tesis. La infección por BLV ocurre generalmente durante los primeros dos años de vida, donde aún los animales jóvenes no han mantenido contacto con el ganado adulto (Merlini et al., 2016). Se propone como estrategia de control, separar los animales acorde a su carga proviral

en sangre periférica ya que existen dos perfiles de infección. Los animales de alta carga proviral y los de baja carga proviral (Juliarena et al., 2007, 2016; Ruggiero et al., 2019). Una consideración importante sobre este hecho es que el ganado infectado con altas cargas virales o LP son considerados una importante fuente de infección dentro del rodeo (Mekata et al., 2015).

En base a la carga proviral, se ha encontrado que los animales con alta carga proviral tienen un porcentaje significativamente menor de células T, tanto células CD4 + como CD8 + (Nieto Farias et al., 2018). La proporción de células T CD4 + y CD8 + puede estar relacionada con la secreción diferencial de citoquinas en las diferentes condiciones para BLV. En efecto, se ha visto que la expresión de citoquinas en respuesta a la infección por BLV se desregula de manera significativa (Nieto Farias et al., 2018). Por otra parte se ha relacionado la presencia de mastitis y la infección con BLV (Watanabe et al., 2019), sugiriendo que la PVL y la estación están asociadas con la severidad de la mastitis clínica, y que la función inmunológica de las células epiteliales en la glándula mamaria está disminuida en vacas con alta PVL en comparación con vacas con las de baja PVL (Watanuki et al., 2019). Las hembras preñadas con una alta carga proviral tienen una mayor probabilidad de infectar a sus terneros en el útero o periparto que aquellos con menor carga proviral (Mekata et al., 2015; Sajiki et al., 2017) y han aumentado los niveles de provirus así como anticuerpos anti-BLV en su calostro (Gutiérrez et al., 2015) en comparación con los con baja carga proviral. Por otro lado la inmunosupresión durante la preñez y el parto se considera un factor de riesgo que se relaciona con la progresión de enfermedades de los bovinos crónicas, como la leucosis bovina. En este sentido, Sajiki et al. (2022) sugieren que la PGE2 inducida por estradiol está involucrada en la supresión de las respuestas Th1 durante el preñez y el parto en el ganado, lo que podría contribuir a la progresión de la infección por BLV (Sajiki et al., 2022). Por lo que refiere al estado de preñez y BLV, sumado a la potenciada disminución de respuesta inmune, este trabajo no encontró asociación entre las carga proviral al virus y los porcentajes de preñez en las vaquillonas estudiadas.

5. COMENTARIOS GENERALES

Como objetivo general de esta tesis, en contribuir en técnicas de diagnóstico para enfermedades de impacto en la producción y reproducción de nuestro país, se ha logrado el desarrollo de dos técnicas moleculares, disponibles en el laboratorio de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria.

Una de ellas, una técnica molecular innovadora como lo es la *droplet digital* PCR para el diagnóstico y cuantificación con alta sensibilidad y especificidad del virus de la Leucosis Bovina. La misma aporta una detección temprana del BLV siendo prometedora para su uso en programas de control de esta enfermedad.

Por otro lado, se estandarizó una nested PCR que permitió así el diagnóstico por primera vez en el país del *gammaherpesvirus bovino tipo 4* en rodeos lecheros. Además, de la detección conjunta de anticuerpos contra virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y el virus de la diarrea viral bovina, aportando conocimientos y herramientas para contribuir a la salud del rodeo nacional.

En cuanto a la respuesta inmune de los animales, se evaluó la inmunogenicidad de cuatro vacunas contra IBR, que se encontraban disponibles comercialmente y que se utilizan en América Central y del Sur (marcas: Virbac-Santa Elena, Microsules, Biogénesis y Merial). Además, se evaluó la posible interferencia de la inmunización simultánea con Fiebre Aftosa o con vacunas clostridiales y el efecto del cambio de marca de las vacunas entre una inmunización y la siguiente. En respuesta a preguntas que realizan frecuentemente colegas y productores sobre el uso de las vacunas, como resultados destacados de este experimento podemos mencionar que solo una vacuna generó niveles de anticuerpos neutralizantes considerados protectores en la mayoría de los animales (86%), habiendo por otra parte vacunas que no lograron estimular a ningún animal 30 días luego de la segunda inmunización. En otro orden, no encontramos interferencias estadísticamente significativas en la inmunización simultánea con vacunas clostridiales o contra la Fiebre Aftosa y se logró una respuesta intermedia utilizando dos marcas distintas del inmunógeno.

En cuanto al estudio de un rodeo de vaquillonas y la interacción del virus inmunosupresor BLV y la respuesta inmune a virosis reproductivas, el presente ensayo no ha podido demostrar que las vaquillonas BLV+ fallaron en su respuesta a la vacunación en comparación con las BLV-, si se obtuvieron sugerencias de que este retrovirus puede reducir la inmunidad protectora y modificar perfiles de respuesta. Debido a la alta prevalencia de esta virosis en los rebaños lecheros de Uruguay, es esencial continuar estudiando las circunstancias por las cuales BLV afecta negativamente al sistema inmunológico de los animales infectados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Kubati, A. A. G., Hussen, J., Kandeel, M., Al-Mubarak, A. I. A., & Hemida, M. G. (2021). Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665128>
2. Alonzo, P., Puentes, R., Benavides, U., Iznardi, F., Piaggio, J., Cavestany, D., Roses, G., & Maisonnave, J. (2012). Effect of Bovine Herpesvirus 1 infection on pregnancy rate of beef cows in Uruguay. *Veterinaria Montevideo*, 48(186), 5–12.
3. Alzamel, N., Bayrou, C., Decreux, A., & Desmecht, D. (2016). Soluble forms of CD46 are detected in *Bos taurus* plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 49, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.09.001>
4. Anziliero, D., Martins, M., Weiss, M., Monteiro, F. L., Ataide, C. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2014). Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciencia Rural*, 45(1), 58–63. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167>
5. Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., & Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1591–1597. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5930>
6. Bartlett, Paul C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Zalucha, J., & Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(8), 914–922. <https://doi.org/10.2460/javma.244.8.914>
7. Biswas, S., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., & H. Patra, P. (2013). Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: A revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, 33(2), 68–81. <https://doi.org/10.1080/01652176.2013.799301>
8. Blagitz, M. G., Souza, F. N., Batista, C. F., Azevedo, L. F. F., Sanchez, E. M. R., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P., & Della Libera, A. M. M. P. (2017). Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Research in Veterinary Science*, 114(March), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.012>
9. Brock, K. ., Widel, P., Walz, P., & Walz, H. . (2007). Onset of protection from experimental infection with type 2 bovine viral diarrhea virus following vaccination with a modified-live vaccine. *Randomized Controlled Trial*.
10. Campos, F. S., Franco, A. C., Oliveira, M. T., Firpo, R., Strelczuk, G., Fontoura, F. E., Kulmann, M. I. R., Maidana, S., Romera, S. A., Spilki, F. R., Silva, A. D., Hübner, S. O., & Roehe, P. M. (2014). Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 171(1–

- 2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.012>
11. Chastant-Maillard, S. (2015). Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(3), 245–251. <https://doi.org/10.1111/tbed.12155>
 12. Cvetojević, D., Savić, B., Milićević, V., Kureljušić, B., Jezdimirović, N., Jakić-Dimić, D., Pavlović, M., & Spalević, L. (2016). Prevalence of Bovine herpesvirus type 4 in aborting dairy cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), 731–736. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0092>
 13. da Silva, L. F., Diel, D. G., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2007). *Cobaias como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina*. 1060–1065.
 14. Da Silva Silveira, C. (2019). *Enfermedades Infecciosas que causan abortos en bovinos con enfoque en rodeos lecheros de Uruguay*. Facultad de Veterinaria-Uruguay.
 15. Donofrio, G., Franceschi, V., Capocéfalo, A., Cavirani, S., & Sheldon, I. M. (2009). Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-83>
 16. Easton C. (2006). *Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay*. Facultad de Veterinaria- UdelaR.
 17. Edgar Valdez, G., Ignasio Pacheco, P., Walter Vergara, A., Juan Pinto, L., Fiorela Fernández, B., Fiorela Guzmán, F., Dennis Navarro, M., & Hermelinda Rivera, G. (2018). Identification of persistently infected cattle and genotype of bovine viral diarrhea virus in cattle of Anta, Cusco, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(4), 1527–1537. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15192>
 18. Emanuelson, U., Scherling, K., & Pettersson, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 12(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90075-Q](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90075-Q)
 19. Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., Render, C. L., Febvay, C., & Houseman, J. T. (2012). Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 727–734. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4760>
 20. Erskine, Ronald J., Bartlett, P. C., Sabo, K. M., & Sordillo, L. M. (2011). Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: Effect on serological response to immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/915747>
 21. Estes, D. M., & Brown, W. C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00201-5)
 22. Evans, C. A., Pinior, B., Larska, M., Graham, D., Schweizer, M., Guidarini, C., Decaro, N., Ridpath, J., & Gates, M. C. (2019). Global knowledge gaps in

- the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 640–652. <https://doi.org/10.1111/tbed.13068>
23. Flores, E. F. (2018). *Diarrea vital bovina: una enfermedad con múltiples presentaciones clínicas*.
 24. Flores, R., & Donis, R. . (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology*, 43(2), 455–475.
 25. Frie, M. C., & Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(3–4), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>
 26. Frie, M. C., Sporer, K. R. B., Benitez, O. J., Wallace, J. C., Droscha, C. J., Bartlett, P. C., & Coussens, P. M. (2017). Dairy cows naturally infected with bovine leukemia virus exhibit abnormal B- and T-Cell phenotypes after primary and secondary exposures to keyhole limpet hemocyanin. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(JUL). <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00112>
 27. Frie, M. C., Sporer, K. R., Wallace, J. C., Maes, R. K., Sordillo, L. M., Bartlett, P. C., & Coussens, P. M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013>
 28. Fulton, R. W., Ridpath, J. F., Confer, A. W., Saliki, J. T., Burge, L. J., & Payton, M. E. (2003). Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: Impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, 31(2), 89–95. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00021-6)
 29. Gao, A., Kouznetsova, V. L., & Tsigelny, I. F. (2020). Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 149(January).
 30. Gates, M. C., Han, J. H., Evans, C. A., Weston, J. F., & Heuer, C. (2019). Assessing the use of diagnostic laboratory accession data to support national bovine viral diarrhoea control in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 67(4), 194–202. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1608329>
 31. Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., & Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4, 1–32. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
 32. Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M. V., Gil, A., & Dargatz, D. A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, 85(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.012>
 33. Gutiérrez, G., Alvarez, I., Merlini, R., Rondelli, F., & Trono, K. (2014). Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*, 10(Figure 1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-82>

34. Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Dus Santos, M. J., Rondelli, F., Fondevila, N., & Trono, K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, *151*(3–4), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.035>
35. Gutiérrez, G., Lomonaco, M., Alvarez, I., Fernandez, F., & Trono, K. (2015). Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Veterinary Microbiology*, *177*(3–4), 366–369. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>
36. Hanon, J. B., Van der Stede, Y., Antonissen, A., Mullender, C., Tignon, M., van den Berg, T., & Caij, B. (2014). Distinction between persistent and transient infection in a bovine viral diarrhoea (bvd) control programme: Appropriate interpretation of real-time RT-PCR and Antigen-ELISA test results. *Transboundary and Emerging Diseases*, *61*(2), 156–162. <https://doi.org/10.1111/tbed.12011>
37. Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., & Caliendo, A. M. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(2), 540–546. <https://doi.org/10.1128/JCM.02620-12>
38. Heriazon, A., Hamilton, K., Huffman, J., Wilkie, B. N., Sears, W., Quinton, M., & Mallard, B. A. (2011). Immunoglobulin isotypes of lactating Holstein cows classified as high, average, and low type-1 or -2 immune responders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *144*(3–4), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.023>
39. Houe, H., Lindberg, A., & Moennig, V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *18*(5), 427–436. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
40. Houe, Hans. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, *64*(2–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)
41. Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Ceriani, M. C., & Esteban, E. N. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *Journal of Dairy Science*, *99*(6), 4586–4589. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>
42. Juliarena, M. A., Gutierrez, S. E., & Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *American Journal of Veterinary Research*, *68*(11), 1220–1225. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1220>
43. Kabeya, H., Ohashi, K., & Onuma, M. (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, *63*(7), 703–708. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.703>
44. Kelling, C. L., Hunsaker, B. D., Steffen, D. J., Topliff, C. L., & Eskridge, K. M. (2007). *Necitopatska Vakcina*. *68*(7), 3–11.
45. Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral

- diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3), 154–163. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>
46. Kobayashi, T., Inagaki, Y., Ohnuki, N., Sato, R., Murakami, S., & Imakawa, K. (2020). Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. *Preventive Veterinary Medicine*, 178(November 2018), 104680. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.009>
 47. Konnai, S., Murata, S., & Ohashi, K. (2017). Immune exhaustion during chronic infections in cattle. In *Journal of Veterinary Medical Science* (Vol. 79, Issue 1, pp. 1–5). Japanese Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0354>
 48. Koutsodontis Cerqueira-Cézar, C., Calero-Bernal, R., Prakash Dubey, J., Maria Gennari, S., & Braz Vet Parasitol, al J. (2017). All about neosporosis in Brazil Tudo sobre neosporose no Brasil. *Electronic) Braz. J. Vet. Parasitol*, 26(3), 253–279. [www.cbpv.org.br/rbpv%0Ahttp://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017045](http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017045)
 49. Kruger, E. R., Penha, T. R., Stoffelo, D. R. E., Roehe, P. M., Ribeiro, M. C., & Soccol, V. T. (2015). Bovine Herpesvirus 4 in Parana State, Brazil: Case report, viral isolation, and molecular identification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 279–283. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130949>
 50. Leites, Mauro; Puentes, R. (2017). Estandarización de una técnica de ELISA indirecto para la detección de isotipos IgG1 e 2 contra Rinotraqueítis infecciosa bovina. *X Jornadas Técnicas Veterinarias*.
 51. Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2020). Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(1), 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>
 52. Macchi, M. V., Suanes, A., Salaberry, X., Fernandez, F., Piaggio, J., & Gil, A. D. (2020). Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 179(December 2019), 105022. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105022>
 53. Macias-Rioseco M. (2019). *Causas de aborto em bovinos lecheros de Uruguay. Facultad de Veterinaria, UDELAR. Uruguay*. Facultad de Veterinaria-Universidad de la Rúplica Oriental del Uruguay.
 54. Marshall, R. B., & Cheresky, A. (1996). Vaccination of dairy cattle against leptospirosis as a means of preventing human infections. *Surveillance-Wellington*, 23(1), 27–28; 5 ref.
 55. Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J., & Rümnapf, T. (2004). CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Virology*, 78(4), 1792–1799. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004>
 56. 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(3), 529–535. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>

57. Mekata, H., Sekiguchi, S., Konnai, S., Kirino, Y., Horii, Y., & Norimine, J. (2015). Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(9), 1115–1120. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0624>
58. Merchioratto, I., Aurélio, A. de A., Villela, J. M., Stone, N. V., Roman, I. J., Traesel, C. K., & Brum, M. C. S. (2020). Immunogenicity in sheep of Uruguayan commercial vaccines against bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. *Ciencia Rural*, 50(4), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190465>
59. Merlini, R., Gutiérrez, G., Alvarez, I., Jaworski, J. P., Carignano, H., Poli, M., Willems, L., & Trono, K. (2016). Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Archives of Virology*, 161(11), 3215–3217. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2973-x>
60. Miller, J. ., Whetstone, C. A., & Van der Maaten, M. . (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*, 52(3), 458-61.
61. Moennig, V., Eicken, K., Flebbe, U., Frey, H. R., Grummer, B., Haas, L., Greiser-Wilke, I., & Liess, B. (2005). Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.011>
62. Moennig, Volker, & Becher, P. (2018). Control of bovine viral diarrhea. *Pathogens*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
63. Moinet, M., Wilkinson, D. A., Aberdein, D., Russell, J. C., Vallée, E., Collins-Emerson, J. M., Heuer, C., & Benschop, J. (2021). Of mice, cattle, and men: A review of the eco-epidemiology of *Leptospira borgpetersenii* serovar ballum. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040189>
64. Morán, P. E., Pérez, S. E., Odeón, A. C., & Verna, A. E. (2015). Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): Aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.007>
65. Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., & Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, 38(2), 181–209. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006059>
66. Newcomer, B. W., Chamorro, M. F., & Walz, P. H. (2017a). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 206(April), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>
67. Newcomer, B. W., Cofield, L. G., Walz, P. H., & Givens, M. D. (2017b). Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 138, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.005>
68. Newcomer, B. W., Walz, P. H., Givens, M. D., & Wilson, A. E. (2015). Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive

- disease: A meta-analysis. *Theriogenology*, 83(3), 360-365.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.028>
69. Nieto Farias, M. V., Souza, F. N., Lendez, P. A., Martínez-Cuesta, L., Santos, K. R., Della Libera, A. M. M. P., Ceriani, M. C., & Dolcini, G. L. (2018). Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 206(March), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.012>
 70. Panei, C. J., Takeshima, S. nosuke, Omori, T., Nunoya, T., Davis, W. C., Ishizaki, H., Matoba, K., & Aida, Y. (2013). Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Veterinary Research*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-95>
 71. Pinheiro-de-Oliveira, T. F., Fonseca, A. A., Camargos, M. F., Laguardia-Nascimento, M., de Oliveira, A. M., Cottorello, A. C. P., Goes-Neto, A., & Barbosa-Stancioli, E. F. (2018). Development of a droplet digital RT-PCR for the quantification of foot-and-mouth virus RNA. *Journal of Virological Methods*, 259, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.015>
 72. Porta, N. G., Alvarez, I., Suarez Archilla, G., Ruiz, V., Abdala, A., & Trono, K. (2019). Experimental infection of sheep with Bovine leukemia virus (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies. *Revista Argentina de Microbiologia*, 51(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.004>
 73. Pospíšil, Z., Krejčí, J., Jínek, P., Lány, P., Zendulková, D., & Cíhal, P. (1996). Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, 53(1–2), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01248-5)
 74. Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., & Heim, D. (2011). Bovine viral diarrhea (BVD) eradication in Switzerland-Experiences of the first two years. *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2–4), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.01.012>
 75. Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., Da Silva, V., Mansilla, F., Sacco, G., Llambí, S., & Capozzo, A. V. (2016a). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Veterinary Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0749-x>
 76. Puentes, Rodrigo, De Brun, L., Algorta, A., Álvarez, J. P., Sacco, G., Oliveira, M., & Llambi, S. (2016b). Horizontal Transmission Dynamics of Bovine Leukemia Virus (Blv) and Negative Effect on Reproductive Performance in Naturally Infected Holstein Heifers. *Science And Animal Health*, 4(3), 294. <https://doi.org/10.15210/sah.v4i3.8295>
 77. Pyeon, D, O'Reilly, K. L., & Splitter, G. A. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *Journal of Virology*, 70(8), 5706–5710.

<https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5706-5710.1996>

78. Pyeon, Dohun, & Splitter, G. A. (1998). Interleukin-12 p40 mRNA Expression in Bovine Leukemia Virus-Infected Animals: Increase in A lymphocytosis but Decrease in Persistent Lymphocytosis. *Journal of Virology*, 72(8), 6917–6921. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.8.6917-6921.1998>
79. Repiso, M. V., Gil, A., Fernandez, L., Guarino, H., Herrera, B., Olivera, M., Osawa, T., & Silva, M. (2005). Prevalencia De Las Principales Enfermedades Infecciosas Que Afectan El Comportamiento Reproductivo En La Ganaderia De Carne Y Caracterizacion De Los Establecimientos De Cria Del Uruguay. *Fpta Nº13*, 40(157), 5–28.
80. 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(June 2016), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>
81. Ridpath, J. F. (2005). Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.003>
82. Riet Correa, F., Monesiglio, C., & Pritsch, O. (2019). Leucosis enzoótica bovina en Uruguay: hacia dónde vamos? *Jornadas de Buiatria*, 51–53.
83. Romera, S. A. (2001). *Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus*. Universidad de Buenos Aires-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
84. Ruggiero, V. J., Norby, B., Benitez, O. J., Hutchinson, H., Sporer, K. R. B., Droscha, C., Swenson, C. L., & Bartlett, P. C. (2019). Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 9165–9175. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16186>
85. Ruiz, V., Porta, N. G., Lomónaco, M., Trono, K., & Alvarez, I. (2018). Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(OCT), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>
86. Sajiki, Y., Konnai, S., Nishimori, A., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., Nagano, M., Kohara, J., Kitano, N., Takahashi, T., Tajima, M., Mekata, H., Horii, Y., Murata, S., & Ohashi, K. (2017). Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(12), 2036–2039. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0391>
87. Sajiki, Y., Konnai, S., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., Kohara, J., Nitani, A., Takahashi, H., Kubota, K., Takeda, H., Murata, S., & Ohashi, K. (2022). Estradiol-induced immune suppression via prostaglandin E2 during parturition in bovine leukemia virus-infected cattle. *Plos One*, 17(3), e0263660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263660>
88. Silva, L. F. da, Weiblen, R., & Flores, E. F. (2007). Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Ciência Rural*, 37(5), 1471–1474. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782007000500042>

89. Sordillo, L. M., Hicks, C. R., & Pighetti, G. M. (1994). Altered Interleukin-2 Production by Lymphocyte Populations from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207(3), 268–273. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-43815>
90. Sozzi, E., Righi, C., Boldini, M., Bazzucchi, M., Pezzoni, G., Gradassi, M., Petrini, S., Lelli, D., Ventura, G., Pierini, I., Moreno, A., Brocchi, E., Lavazza, A., & De Mia, G. M. (2020). Cross-reactivity antibody response after vaccination with modified live and killed bovine viral diarrhoea virus (BVD) vaccines. *Vaccines*, 8(3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030374>
91. Spilki, F., Franco, A., & Roehle, P. . (2012). Analysis of isotype-specific antibody responses to bovine herpesviruses 1.1 and 1.2a allows to estimate the stage of infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 586–593.
92. Suanes, A., Macchi, V., Fernández, F., Moreira, C., Gil, A., Laboratorios, D. De, Miguel, V., Ganadería, M. De, Ruta, P., & Gral, B. (2021). Reproductive, health and management characteristics in dairy herds in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 47(215), 1–11. <https://doi.org/10.29155/vet.57.215.3>
93. Thulke, H. H., Lange, M., Tratalos, J. A., Clegg, T. A., McGrath, G., O’Grady, L., O’Sullivan, P., Doherty, M. L., Graham, D. A., & More, S. J. (2018). Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. *Preventive Veterinary Medicine*, 150(November 2017), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.017>
94. Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Haddad, J. P., Tremblay, R., Scott, H. M., & Whiting, T. (2007). Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 659–669. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71548-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71548-5)
95. Tizard, I. (2000). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. ELSEVIER.
96. Toker, E. B., Aytogu, G., Kadiroglu, B., Ates, O., & Yesilbag, K. (2020). Failure in dry period vaccination strategy for bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 247(May). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108797>
97. Van Campen, H., Vorpahl, P., Huzurbazar, S., Edwards, J., & Cavender, J. (2000). A case report: Evidence for type 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(3), 263–265. <https://doi.org/10.1177/104063870001200312>
98. VanLeeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A., & Tremblay, R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 94(1–2), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012>
99. Verna, A. E., Manrique, J. M., Pérez, S. E., Leunda, M. R., Pereyra, S. B., Jones, L. R., & Odeón, A. C. (2012). Genomic analysis of bovine herpesvirus

- type 4 (BoHV-4) from Argentina: High genetic variability and novel phylogenetic groups. *Veterinary Microbiology*, 160(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.039>
100. Watanabe, A., Murakami, H., Kakinuma, S., Murao, K., Ohmae, K., Isobe, N., Akamatsu, H., Seto, T., Hashimura, S., Konda, K., Shinozuka, Y., & Kawai, K. (2019). Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(10), 1431–1437. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0285>
 101. Watanuki, S., Takeshima, S. N., Borjigin, L., Sato, H., Bai, L., Murakami, H., Sato, R., Ishizaki, H., Matsumoto, Y., & Aida, Y. (2019). Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Veterinary Research*, 50(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1>
 102. White, R. A., Quake, S. R., & Curr, K. (2012). Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *Journal of Virological Methods*, 179(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.017>
 103. World Organisation for Animal health (OIE). (2018). Leucosis Bovina Enzoótica Capítulo 3.4.9. *Manual Terrestre de La OIE*. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.09_Leucosis_bovina_enzoótica.pdf
 104. World Organization for Animal Health. (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In *OIE* (8th ed.).
 105. Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., & Trainin, Z. (1998). Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(3), 207–218. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00136-6)
 106. Yarnall, M. J., & Thrusfield, M. V. (2017). Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: A systematic review of economic impact. *Veterinary Record*, 181(13), 347. <https://doi.org/10.1136/vr.104370>
 107. Zezafoun, H., Decreux, A., & Desmecht, D. (2011). Genetic and splice variations of *Bos taurus* CD46 shift cell permissivity to BVDV, the bovine pestivirus. *Veterinary Microbiology*, 152(3–4), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.028>

7. ANEXO

Otros trabajos en cooperación realizados durante el transcurso de la tesis doctoral:

1. Alonso, M., Zabala, C., Mansilla, S., **De Brun, L.**, Martínez, J., Garau, M., Rivas, G., Acosta, C., Lens, D., Cerisola, A., Graña, M., Naya, H., Puentes, R., Spangenberg, L., Raggio, V., Lemes, A., Castro, L., & Quijano, C. (2021). Blood cell respiration rates and mtDNA copy number: A promising tool for the diagnosis of mitochondrial disease. *Mitochondrion*, 61, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.09.004>

Mitochondrion 61 (2021) 31–43



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito



Blood cell respiration rates and mtDNA copy number: A promising tool for the diagnosis of mitochondrial disease

Martina Alonso^{a,b}, Cristina Zabala^{c,d}, Santiago Mansilla^{b,e}, Laureana De Brun^f, Jennyfer Martínez^{a,b}, Mariela Garau^e, Gabriela Rivas^g, Cecilia Acosta^g, Daniela Lens^h, Alfredo Cerisola^{d,i}, Martín Graña^j, Hugo Naya^{j,k}, Rodrigo Puentes^f, Lucía Spangenberg^j, Víctor Raggio^l, Aída Lemes^d, Laura Castro^{a,b,m}, Celia Quijano^{a,b,n}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

^b Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Uruguay

^c Clínica Pediátrica A, Centro Hospitalario Pereira Rossell, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

^d Centro de Referencia Nacional en Defectos Congénitos y Enfermedades Raras (CRENADECER) del Banco de Previsión Social (BPS), Uruguay

^e Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

^f Departamento de Patobiología, Unidad de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

^g Cátedra y Departamento de Hemoterapia y Medicina Transfusional, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

^h Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

ⁱ Cátedra de Neuropediatría, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

^j Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

^k Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay

^l Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

2. Meny, P., Iglesias, T., Menéndez, C., Quintero, J., Ríos, C., Ashfield, N., Ferreira, O., Mosca, V., **De Brun, L.**, Ortiz, G., De Vries, I., Varela, G., & Schelotto, F. (2022). Seroprevalence of anti-*Leptospira* antibodies in equines and associated workers—Isolation of *Leptospira interrogans* serogroup Canicola from equine urine. *Zoonoses and public health*, 69(5), 526–536. <https://doi.org/10.1111/zph.12942>

Received: 3 November 2021 | Revised: 21 January 2022 | Accepted: 14 March 2022
DOI: 10.1111/zph.12942

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Seroprevalence of anti-*Leptospira* antibodies in equines and associated workers—Isolation of *Leptospira interrogans* serogroup Canicola from equine urine

Paulina Meny¹ | Tamara Iglesias¹ | Clara Menéndez¹ | Jair Quintero¹ | Cristina Ríos² |
Natalia Ashfield¹ | Oscar Ferreira² | Virginia Mosca² | Laureana De Brun² |
Gabriela Ortiz² | Isabel De Vries² | Gustavo Varela¹ | Felipe Schelotto¹ 