



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Postgrados**

**EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y EFECTO DE LA PRESENCIA  
DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN ANIMALES  
ASINTOMÁTICOS SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS,  
REPRODUCTIVOS Y SANITARIOS.**

**Rodrigo E. Puentes Palombo**

**TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2016**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Postgrados**

**EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y EFECTO DE LA PRESENCIA  
DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN ANIMALES  
ASINTOMÁTICOS SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS,  
REPRODUCTIVOS Y SANITARIOS.**

**Rodrigo E. Puentes Palombo**

---

**Silvia Llambí Dellacasa**  
Director de Tesis

---

**Otto Pritsch**  
Co-Director de Tesis

---

**Paula Nicolini**  
Co-Director de Tesis

**2016**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**

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

**“EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y EFECTO DE LA  
PRESENCIA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA  
ENZOÓTICA EN ANIMALES ASINTOMÁTICOS SOBRE  
PARÁMETROS PRODUCTIVOS, REPRODUCTIVOS Y  
SANITARIOS”**


---

**Por: Mag. Rodrigo E. PUENTES PALOMBO**

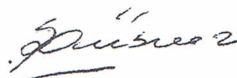
**Directora de Tesis:** Dra. Silvia Llambí  
**Codirectores de Tesis:** Dr. Otto Pritsch  
Dra. Paula Nicolini

**Tribunal**


**Presidente:** Dr. Franklin Riet-Correa



**Segundo Miembro:** Dra. Silvia Hubner



**Tercer Miembro:** Dra. Jacqueline Maisonnave



**Fallo del Tribunal:**

*Aprobado con Reserwa*



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
**Postgrados Académicos y Especializaciones**

El Tribunal considera que el Doctorando Mag. Rodrigo Puentes ha realizado un trabajo de Tesis adecuado para la obtención del Título, con una buena redacción escrita, adecuada revisión bibliográfica para sustentar la hipótesis y objetivos planteados.

Los resultados obtenidos se presentan de forma clara, demostrando una excelente capacidad oratoria, siendo un aporte al conocimiento de la leucosis bovina.

Los resultados de esta Tesis tienen un alto impacto tanto en Medicina Veterinaria como para la producción lechera del Uruguay. Como en toda buena investigación, se abren nuevos caminos de investigación en esta disciplina.

La Defensa oral fue clara, concisa y amena, respaldada por un adecuado material audiovisual, demostrando profundo conocimiento y responsabilidad en el desarrollo del trabajo de Tesis. Destacamos la solvencia en el razonamiento llevado a cabo en las respuestas a las preguntas planteadas por el Tribunal, que denotan el grado de compromiso durante el proceso de formación.

Por lo anteriormente expresado, el Tribunal, por unanimidad, califica el trabajo de Tesis de Doctorado en Salud Animal del Mag. Rodrigo Puentes: EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y EFECTO DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN ANIMALES ASINTOMÁTICOS SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS, REPRODUCTIVOS Y SANITARIOS, como Aprobado con Mención.

  
Dr. Franklin Riet-Correa  
Presidente del Tribunal

## Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi familia por estar siempre y apoyarme en toda mi carrera.

A mis tutores por dedicarle su tiempo en mi formación.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la Republica.

A mis compañeros del área de Inmunología.

A todos mis amigos.

## Índice

**Resumen, 1**

**Abstract, 2**

**Introducción, 3**

**Hipótesis, 7**

**Objetivos, 7**

**Objetivos generales, 7**

**Objetivos específicos, 7**

**Materiales y Métodos, 8**

- A. Experimento 1 (asociado a los objetivos específicos 1 y 2),
  - A.1 Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas.
  - A.2 Obtención de muestras
  - A.3 Detección de anticuerpos anti gp51 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)
  - A.4 Elaboración de registros
  - A.5 Análisis estadístico.
- B. Experimento 2 (asociado al objetivo específico 3),
  - B.1 Muestra de los animales.
  - B.2 ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina (VLB).
  - B.3 Seroneutralización (SN) *in vitro* para Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) y Diarrea Viral bovina (BVD).
  - B.4 ELISA para la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* y *Neospora caninum*
  - B.5 Rosa de bengala para el diagnóstico serológico de Brucelosis
  - B.6 Test de aglutinación microscópica (MAT) para cuantificación de anticuerpos contra *Leptospira interrogans spp.*
  - B.7 Elaboración de registros y análisis estadísticos
- C. Experimento 3 (asociado al objetivo específico 4),
  - C.1 Diseño experimental y conformación de los grupos de animales
  - C.2 ELISA para la detección y cuantificación de anticuerpos contra VLB.
  - C.3 Inmunización contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis
  - C.4 ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE) para la detección de anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa (cepa A24/Cruzeiro).
  - C.5 Índice de avidéz (IA) de los anticuerpos contra Fiebre Aftosa mediante ELISA
  - C.6 Respuesta de los isotipos contra A24/Cruzeiro mediante ELISA
  - C.7 Detección de anticuerpos anti toxina alfa, beta y épsilon de *Clostridium Perfringens*

mediante ELISA.

C.8 Análisis estadísticos de los resultados

D. Experimento 4 (asociado al objetivo específico 5),

D.1 Selección de las muestras

D.2 *Nested polymerase chain reaction* (nPCR)

D.3 *Droplet digital PCR* (ddPCR)

D.4 Análisis de los datos

## **Resultados generales, 17**

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3

Experimento 4

## **Discusión y conclusiones, 31**

## **Perspectivas, 36**

## **Referencias bibliográficas, 37**

### **Anexos**

Puentes R, De Brun L, Algorta A, Alvarez JP, Sacco G, Oliveira M, Llambí S. (2016a).

Horizontal transmission dynamics of Bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected holstein heifers. *Science and animal health. In press.*

Puentes R, De Brun L, Algorta A, Da Silva V, Mansilla F, Sacco G, Llambí S, Capozzo AV. (2016b). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res.* 12(1):119.

Puentes R, Panei CJ, Flatschart A, Gomes, B, De Brun L, Leites M, Galosi C, Nicolini P, LLambí S, Flatschart R. (2016c). Molecular diagnosis of bovine leukemia virus based on the Droplet Digital PCR Enviado a Veterinaria (Montevideo)





## **Resumen**

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad producida por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que afecta a sistemas productivos intensivos, principalmente bovinos de leche. La mayoría (~ 90%) de los animales infectados son portadores asintomáticos del virus y clínicamente sanos, siendo posible detectar la presencia de anticuerpos circulantes anti-VLB o del ADN proviral en los linfocitos infectados. En Uruguay, la principal importancia de esta infección radica en las restricciones en los mercados internacionales para la exportación de animales en pie, siendo un problema que se agrava cada vez más en nuestro país ya que conlleva a la permanencia de los animales seropositivos en los rodeos. Sin embargo, se desconoce con precisión el impacto real de la presencia del virus en portadores asintomáticos sobre parámetros productivos, reproductivos y sanitarios. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis doctoral es aportar conocimiento original vinculado a estos aspectos. En primer lugar, se determinó una tasa de seroconversión anual de 39.8% en un sistema de cría modelo de vaquillonas Holando en Uruguay, encontrándose un efecto negativo sobre los índices de concepción en vaquillonas infectadas con VLB. En segundo lugar, se encontraron asociaciones a campo entre animales seropositivos a VLB y la presencia de anticuerpos contra enfermedades de la reproducción; específicamente se encontró una asociación negativa con Herpesvirus bovino – 1 y *Leptospira spp.* Asimismo, al inmunizar contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis bovinos infectados con VLB, se encontró una respuesta significativamente menor en los títulos de IgM e IgG1 contra Fiebre Aftosa. Finalmente, y en relación con el diagnóstico de VLB, se estandarizó una nueva herramienta molecular llamada *Droplet Digital PCR* que permitió detectar un 26% más de animales positivos que por la técnica de referencia de la OIE (*nested PCR*). Estos resultados buscan responder algunas preguntas desde el punto de vista práctico de este virus en producción bovina. A raíz de estos hallazgos se generaron nuevas hipótesis que deben ser profundizadas en futuros experimentos.

## **Abstract**

Enzootic bovine leukosis (EBL) is caused by the Bovine leukemia virus (BLV) affecting intensive production systems, mainly dairy cattle. Most infected animals (about 90%) are asymptomatic and clinically healthy, being possible to detect the presence of antibodies or proviral DNA in infected cells. The main importance of this infection for Uruguay is the restrictions in international markets for the export of live animals. This is a problem that is increasingly worse in our country as this leads to the permanence of seropositive animals. On the other hand, the real impact of the virus in asymptomatic carriers on productive, reproductive and health parameters are not known precisely. The overall objective of this thesis aims to contribute original knowledge related to these aspects. First, an annual rate of 39.8% seroconversion was determined in a group of Holstein heifers confined in a rearing system in Uruguay, finding a negative effect on conception rates in heifers infected with BLV. Second, associations between BLV seropositive animals and the presence of antibodies against reproductive diseases were found, specifically a negative association with Bovine herpesvirus - 1 and *Leptospira* spp. On the other hand, after to immunizing BLV positive animals against FMD and Clostridiosis, a significantly lower response was found in the titles of IgM and IgG1 against FMD. Finally, based on the diagnosis of the virus, a new molecular tool called Droplet Digital PCR was standardized and allowed the detection of 26% more positive animals when compared by the technique of OIE Reference (nested PCR). These results seek to answer some questions from the practical point of view of this virus in cattle production. From these findings, new hypotheses are created and should be deepened in future experiments.

## **Introducción**

El Virus de la Leucosis Bovina (VLB) es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo. Es un retrovirus exógeno que junto con el virus T-linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV) pertenece al género *Deltaretrovirus*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, familia *Retroviridae*. Es un virus ARN que afecta a células de la línea linfocítica, principalmente a los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M (IgM) en su superficie. Luego de la infección, el genoma de VLB se integra al genoma celular en forma de provirus. El VLB también persiste en células como los monocitos y macrófagos (Burny et al., 1988; Aida et al., 1989; Kettmann et al., 1994).

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

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

En Uruguay la prevalencia serológica de VLB en rodeos lecheros es muy alta, incluso en animales jóvenes, donde se ha encontrado una prevalencia de cerca del 50% (Puentes et al., 2016a). El 60%

de los animales infectados son asintomáticos y cerca del 90% son clínicamente sanos, produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a las barreras sanitarias que muchos países imponen para la exportación de animales en pie seropositivos para VLB, disminución de la producción láctea, disminución de la longevidad del animal y disfunciones en el sistema inmune (Bartlett et al., 2013). En Uruguay no se han calculado las pérdidas que produce la presencia de este virus en el rodeo nacional. Sin embargo, en Estados Unidos se ha estimado que la infección subclínica produce pérdidas de 95Kg/vaca/año de leche por cada 10% de aumento de la prevalencia de VLB en los tambos infectados. Esto representa pérdidas de 285 millones de dólares anuales a los productores de ese país (Bartlett et al., 2013).

El impacto del virus en la longevidad de la vaca también se ha estudiado, demostrándose que las vacas con mayores títulos de anticuerpos contra VLB tienen un 40% más de probabilidad de ser refugadas (Bartlett et al., 2013). En relación con aspectos reproductivos, si bien los resultados de las investigaciones que se han realizado hasta el momento son contradictorios, algunos autores han encontrado una disminución en la tasa de concepción en vacas seropositivas al VLB (Vanleeuwen et al., 2010). Históricamente en Uruguay, la tasa de procreo se ha situado en torno al 60-70% (MGAP, 2014), lo que significa 2.530.200 terneros menos cada año. Las causas de estas pérdidas son múltiples y muchas veces relacionadas entre sí. Sin embargo, se desconoce si VLB participa directa o indirectamente en ese resultado.

Por otro lado, también se ha demostrado que la infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune que impactan directamente en la sanidad (Bartlett et al., 2014), como por ejemplo la disminución de la función de los polimorfonucleares *in vitro* inducido por *Escherichia coli* (*E. coli*) en vacas infectadas (Souza et al., 2012). El VLB no solo causa inmunodepresión sino que además genera disturbios inmunológicos a nivel de la inmunidad celular, modificando el perfil de las células T, que son claves en la regulación del sistema inmune tanto en infecciones naturales como en respuesta a inmunizaciones por vacunación. En este sentido, Erskine et al. (2011), en ensayos a campo, encontraron que vacas infectadas con VLB tuvieron un menor título de IgG2 contra *E. coli* J5 (vacuna utilizada contra la mastitis) en comparación con vacas no infectadas.

Para el diagnóstico viral, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) recomienda el uso de las pruebas de ELISA e Inmunodifusión en gel agar (IDGA) para la detección de anticuerpos y el aislamiento viral o la técnica de *nested* PCR (*nPCR*) para la identificación molecular del agente (OIE, 2012). En los últimos años, se han desarrollado técnicas para la cuantificación de la carga proviral en células de animales infectados utilizando *Real time* PCR (qPCR) (Rola-Łuszczak et al., 2013). Si bien hasta el momento, esta técnica no ha sido incluida dentro de los métodos diagnósticos avalados por la OIE, puede ser muy útil para asociar la relación existente entre la

cantidad de provirus y el efecto negativo que el mismo produce en los animales infectados. Sin embargo, esta técnica posee algunas limitaciones que serán discutidas más adelante. En los últimos años, se desarrolló una nueva técnica, denominada *Droplet digital* PCR (ddPCR), que permite una cuantificación viral con una alta sensibilidad y precisión, con algunas ventajas claras comparadas con la qPCR. La técnica aplica fundamentos tanto de la PCR convencional como de la qPCR. La mezcla de PCR junto con el gen de interés, son fraccionados en miles de gotas de tamaño del orden de los nanómetros siendo subsecuentemente amplificadas en un termociclador convencional. Posteriormente todas las gotas son analizadas por señal de fluorescencia en un equipo especializado. Cada evento independiente (*droplet*) es definido como positivo o negativo según la amplitud de la señal fluorescente. Finalmente, y utilizando algoritmos de Poisson, se determina el número de copias absolutas en la muestra original con independencia de una curva estándar (Pinheiro et al. 2012). Esta nueva herramienta, aún no ha sido utilizada masivamente para el diagnóstico de enfermedades virales tanto en animales como en humanos, aunque recientemente ha sido estandarizada para la cuantificación del virus linfotrópico de células T Humanas (HTLV) y para el virus de la Inmunodeficiencia humana (HIV), ambos pertenecientes a la misma familia que el virus de la Leucosis enzoótica bovina.

Desde el punto de vista del control de VLB, durante los últimos años ha habido una serie de intentos de desarrollar una vacuna contra el virus, pero no se han obtenido aún resultados concluyentes (Gutiérrez et al., 2014). Por esta razón, el control de la enfermedad se basa en su diagnóstico mediante pruebas serológicas. En ese sentido, se han planteado 3 estrategias básicas para el control de la infección por VLB:

1. *Identificación de animales positivos y sacrificio*: La principal limitante de la implementación de este programa es la alta prevalencia inicial y el valor de los animales así como su potencial genético y reproductivo. Los programas de erradicación solo pueden ser utilizados si la prevalencia es de un 1%, para que el número de animales removidos no afecte la producción. Este tipo de programa implica políticas de compensación económicas para los productores, lo cual contribuye a la falta de adherencia y falla de estos programas. Los países Europeos han optado por esta estrategia radical, sin embargo en países como Estados Unidos, Argentina, Canadá y Japón, esto no es posible debido a las altas prevalencias, pérdidas de material genético y cuestionables pérdidas económicas (Pelzer, 1997; Rodríguez et al., 2011).

2. *Identificación de animales positivos y segregación*: Está basado en la segregación de animales positivos en lugar de sacrificarlos. Este tipo de programa permite que el productor mantenga animales de alta producción, o genéticamente superiores al mismo tiempo que reduce la incidencia de la infección (Pelzer, 1997). Este programa consiste en mantener los animales seropositivos en un

rodeo separados de los animales seronegativos o la realización de un manejo diferencial entre animales infectados y no infectados que cohabitan en un mismo predio. Las desventajas incluyen un incremento de costos, el aumento de labor por manejo de varios rodeos en una misma unidad de producción y requiere una adherencia al programa a largo plazo.

3. *Monitoreo e implementación de medidas de manejo correctivas*: Este programa se enfoca en limitar la transferencia de células infectada presentes en sangre, leche, secreciones, excreciones, jeringas e instrumentos quirúrgicos (Rodríguez et al., 2011). Comparado con las estrategias anteriores, esta no requiere realizar mayores inversiones o eliminación de animales. Las principales desventajas de este programa es el cambio de rutina en el establecimiento, entrenamiento del personal, estar sujeto al factor humano y la existencia de otras fuentes de infección como los insectos hematófagos. En este tipo de estrategias, es posible que los resultados no sean evidentes hasta luego de varios años.

Podría haber una cuarta estrategia basada en la selección genética de ganado resistente a la infección contra VLB o animales con baja carga de provirus (Juliarena et al., 2016). El inconveniente de este tipo de selección, es la limitación de la selección de los animales para otras características fenotípicas con interés productivo distinto.

Sobre estos antecedentes, la presente tesis doctoral pretende aportar conocimiento original fundamentalmente en tres aspectos. Por un lado, evaluar la dinámica de la seroconversión del virus a lo largo del tiempo y su efecto sobre parámetros productivos y reproductivos. Por otra parte, evaluar la interferencia de VLB frente a la vacunación contra patógenos de interés (Fiebre Aftosa y Clostridiosis), así como posibles asociaciones entre VLB y la infección natural con enfermedades de la reproducción (IBR, BVD, Leptospirosis, Neosporosis, Clamydiosis y Brucelosis). Finalmente, otro aspecto a aportar es lograr estandarizar la técnica *ddPCR* para una detección más precoz de VLB en animales asintomáticos o con baja carga de provirus.

## **Hipótesis**

1. Los animales infectados con VLB tienen afectada su performance productiva y reproductiva e inmunológicamente responden menos a la vacunación contra otros patógenos.
2. Existe sub-diagnóstico de VLB en animales portadores asintomáticos, los que pueden ser detectados por técnicas moleculares más sensibles que los métodos avalados por la OIE.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el impacto a nivel productivo, reproductivo y sanitario de la infección por VLB en bovinos Holando asintomáticos y estandarizar una nueva técnica molecular para su diagnóstico.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el grado de transmisión horizontal de VLB a lo largo del tiempo en un campo de cría de vaquillonas Holando en Uruguay
2. Analizar el impacto en los índices productivos y reproductivos en animales portadores de VLB.
3. Evaluar posibles asociaciones inmunológicas naturales entre VLB y enfermedades infecciosas de interés reproductivo.
4. Evaluar la respuesta inmune humoral contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis en bovinos portadores del VLB.
5. Estandarizar la técnica *ddPCR* para el diagnóstico y la cuantificación de la carga proviral de VLB en sangre periférica de animales portadores asintomáticos.



## **Materiales y métodos**

El trabajo se dividió en 4 experimentos independientes, que serán descritos separadamente en esta sección. En los casos en que correspondió, se obtuvo la aprobación del protocolo experimental por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (UdelaR) (protocolos n° 07/14 Exp. 111130-000302-14)

### **A. Experimento 1 (asociado a los objetivos específicos 1 y 2).**

*Objetivos específicos 1 y 2: Determinar el grado de transmisión horizontal del VLB a lo largo del tiempo en un campo de recría de vaquillonas holando y determinar el impacto en los índices productivos y reproductivos en animales portadores del virus.*

#### **A.1.- Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas.**

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

Al ingreso, las vaquillonas son identificadas con una caravana que indica el productor y el número asignado al animal. Luego son pesadas, desparasitadas y sometidas a un plan sanitario preestablecido (Cuadro I). Durante los primeros 30 días los animales de los distintos productores se encuentran en un mismo lote de "cuarentena" sobre pasturas. Posteriormente, y según el peso, ingresan en lotes al rodeo general de aproximadamente 3500 animales (integrado por un total de 108 productores). La recría se realiza sobre campos mejorados, praderas, verdes y con suplemento de grano húmedo y heno en la época de menor oferta de forraje y a las categorías que lo requieren.

El manejo reproductivo del establecimiento se realiza en dos periodos al año (Junio-Julio y Noviembre-Diciembre) y consiste en la sincronización de las vaquillonas, detección de celo (visto dos veces por día), inseminación artificial (IA, hasta tres por animal), repaso con toros luego de cada periodo de IA y diagnóstico de gestación por ecografía y tacto rectal.

Como medida higiénico-sanitaria de rutina, las agujas de las jeringas multidosis, el material de descorne, el material quirúrgico, los guantes y cualquier material que entre en contacto con sangre, se sumerge en desinfectantes (DESPADAC - CALIER® España).

**Cuadro I-** Medidas de manejo y sanidad aplicadas en el establecimiento de recría Holando de la cuenca lechera Sur del Uruguay

<b>ACTIVIDAD</b>	
<b>Día 0 (Ingreso):</b>	Identificación. Vacunación contra Clostridios. Desparasitación.
<b>Día 7:</b>	Vacunación contra carbunco. Tuberculinización.
<b>Día 14:</b>	Vacunación con RB51 y contra Queratoconjuntivitis.
<b>Día 21:</b>	Descorne. Suplemento vitamínico.
<b>Día 30:</b>	Segunda dosis contra clostridios. Distribución por peso e ingreso al rodeo general.
<b>Al año de ingreso:</b>	Revacunación contra clostridios cada 6 meses. Revacunación anual contra queratoconjuntivitis. Revacunación Aftosa. Antiparasitarios según coprología. Vacunación contra enfermedades reproductivas.
Suplementación con sales minerales. Registro mensual del peso de los animales.	
*Todas las vacunaciones son realizadas con jeringa multidosis, sumergiéndolas en desinfectantes entre animales.	

A.2.- Obtención de muestras

El trabajo comprendió un muestreo de 389 animales pertenecientes a 29 productores del establecimiento mencionado en el punto A.1. Al ingreso de los animales al campo de recría se les extrajo sangre sin anticoagulante, y los sueros fueron procesados mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, punto A.3), identificándose así los animales seronegativos que se utilizaron para el experimento. El muestreo se reiteró cada 3 meses aproximadamente, durante 18 meses (2011-2013), hasta el regreso de los animales a su establecimiento de origen.

A.3.- Detección de anticuerpos contra VLB mediante (ELISA)

Para la detección de anticuerpos en suero contra la glicoproteína de superficie gp51 de VLB se utilizaron kits ELISA comerciales con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA, aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizándose 50 µl de suero con dilución 1:25. La lectura se realizó a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 620 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres sueros control positivos débiles por placa, y se estableció la línea de corte para cada placa a partir del promedio de las lecturas de las densidades ópticas (DO) de dichos controles. Según las DO de las muestras positivas

se las clasificó en positivo débil, moderado o fuerte (Gutiérrez et al., 2012).

#### A.4.-Elaboración de registros

Se elaboraron planillas utilizando Microsoft office Excel con el fin de visualizar la evolución serológica en relación a las medidas de manejo sanitario y reproductivo en el período de estudio. Se registró la evolución del estado serológico de cada animal durante 18 meses así como la fecha en que se realizaron actividades de manejo sanitario, registro de peso y manejo reproductivo.

#### A.5.- Análisis estadístico.

Se realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos en los 5 muestreos realizados durante los 18 meses de estudio (uno cada 3 meses, aproximadamente). Se evaluó la existencia de animales infectados mediante seroconversión y se utilizaron tablas de registro diagramadas para dicha actividad. La prevalencia de VLB se estimó con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%). Suponiendo un 20% de tasa de transmisión, el error al determinar el IC 95% fue de  $\pm 7,8\%$ . Para determinar las diferencias entre las distintas variables analizadas (ganancia de peso, manifestación de celo, número de servicios, tasa de concepción y porcentaje de preñez), se utilizó la prueba de Chi<sup>2</sup>, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . El análisis estadístico fue realizado con el software STATA v 11.2 (StataCorp, 2009).

### **B. Experimento 2 (asociado al objetivo específico 3).**

*Objetivo específico 3: Evaluar asociaciones naturales entre el VLB y otras enfermedades infecciosas de interés reproductivo.*

#### B.1.- Obtención de muestras.

Se partió de un banco de suero (-20 °C) de ganado Holando, formado en el año 2009 en el área de Inmunología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, con muestras provenientes de los Departamentos de Tacuarembó, Florida y Durazno. Se utilizaron 655 muestras de 41 productores y sus respectivos registros correspondientes a: Departamento, localidad, productor y edad del animal (por dentición).

#### B.2.- Detección de anticuerpos contra VLB mediante ELISA

La técnica utilizada y la metodología empleada fue la misma descrita en el punto A.3.

#### B.3.- Seroneutralización (SN) *in vitro* para Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) y Diarrea Viral bovina (BVD).

Los anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 (agente de IBR) y BVD fueron evaluados mediante la técnica de SN *in vitro* recomendada por la OIE (OIE, 2010). Brevemente, 50 µl de cada suero

fueron mezclados con 50 µl de 100 TCID<sub>50</sub> (50% dosis infectante de cultivo 50) de virus. Luego de 24hs de incubación a 37 °C, se agregaron 100 µl de una suspensión celular de la línea *Madin-Darby bovine kidney* - MDBK (3 x 10<sup>4</sup> células). Las placas fueron incubadas en estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días, observándose diariamente la presencia de efecto citopático. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó mediante el método de Reed & Muench (1938).

#### B.4.- Detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* y *Neospora caninum* mediante ELISA

Para ambas enfermedades se utilizaron kits de ELISA comerciales disponibles en plaza para la cuantificación de anticuerpos en bovinos (IDEXX Neospora X2 Ab Referencia: 99-09566; IDEXX Chlamydiosis Total Ab Test Referencia: CLA1135T). En ambos casos las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y las lecturas se realizaron a una  $\lambda=450$  nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

#### B.5.- Diagnóstico serológico de Brucelosis mediante la prueba Rosa de Bengala

Para el diagnóstico de Brucelosis bovina, se empleó la técnica de aglutinación en placa Rosa de Bengala utilizando un kit comercial gentilmente cedido por el Laboratorio Virbac-Santa Elena. La técnica se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y las muestras fueron consideradas positivas en presencia de grumos de cualquier intensidad.

#### B.6.- Cuantificación de anticuerpos contra *Leptospira interrogans spp* mediante el test de aglutinación microscópica (MAT).

Para el diagnóstico de Leptospirosis se utilizó el MAT (técnica de referencia para la OIE), que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes en suero bovino con el fin de evidenciar una exposición previa al patógeno en bovinos no vacunados, utilizando como punto de corte títulos iguales o superiores a 1:100 (OIE, 2008). Brevemente, se mezclaron partes iguales de antígenos bacterianos y suero bovino en diluciones seriadas y mediante microscopio de campo oscuro se visualizó la aglutinación existente. Como antígenos se utilizaron 12 serovars de *Leptospira interrogans* (*Ballum*, *Bratislava*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Hardjo bovis*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Tarassovi*, *Wolfi*). La técnica se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, UdelaR, siguiendo los procedimientos estándar descritos por la OIE.

#### B.7.- Elaboración de registros y análisis estadísticos

Cada animal se registró con un número, edad, Departamento y establecimiento de procedencia, así como los resultados de diagnóstico (positivo o negativo) para cada enfermedad. Para el análisis

estadístico se aplicó la Prueba de Chi<sup>2</sup> y un análisis de varianza (ANOVA) en los casos donde hubo relación entre VLB y las demás enfermedades reproductivas estudiadas. El nivel de significancia fue  $\alpha = 0,05$ .

### **C. Experimento 3 (asociado al objetivo específico 4).**

*Objetivo específico 4: Evaluar la respuesta inmune humoral contra Fiebre Aftosa y Clostridios en bovinos portadores del VLB.*

#### C.1.- Diseño experimental y conformación de los grupos de animales

Se tomaron muestras de sangre por venopunción coccígea en unos 100 bovinos Holando de entre 6 a 8 meses de edad y sin antecedentes de vacunación contra Fiebre aftosa ni Clostridios. Los animales pertenecían al mismo campo de cría mencionado en el punto A1. Las muestras fueron extraídas en tubos con y sin anticoagulante y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Del total de 100 animales, se conformaron dos grupos:

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

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

A todos los animales se les realizó un hemograma a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el fin de detectar animales con leucocitosis o linfocitosis persistente al inicio del experimento, utilizando el protocolo descrito por Marshak (1968).

C.2.- Detección y cuantificación de anticuerpos contra VLB mediante ELISA. La técnica utilizada y la metodología empleada fue la misma descrita en el punto A.3.

#### C.3.- Inmunización contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis

Una vez obtenido los grupos de animales según el status para VLB, se procedió a la inmunización con vacunas comerciales contra Fiebre Aftosa y Clostridiosis. El campo de cría realiza estratégicamente la inmunización contra Clostridiosis al ingreso de los animales al campo y una revacunación a los 30 días. Se realizó extracción de sangre en el momento de la primoinmunización (día 0) y luego a los 30, 60, 90, 180 y 365 días. En el caso de la Fiebre Aftosa, la legislación vigente obliga a la vacunación en el mes de mayo de todos los animales menores de dos años (categoría que se utilizó en este experimento). En este caso, se comenzó el experimento de forma coordinada para

lograr una muestra en la primoinmunización (día 0) y posteriormente a los días 15, 60, 165 y 300. Todos los animales recibieron una única dosis de la vacuna comercial utilizada en el país, vía subcutánea en la tabla del cuello. Este experimento se inició con un desfase de al menos 60 días respecto a la inmunización contra Clostridio, para minimizar la interferencia entre ambas vacunaciones.

#### C.4.- Detección de anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa (cepa A24/Cruzeiro) mediante ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE).

Los títulos de anticuerpos totales contra A24/Cruzeiro fueron evaluados en muestras de suero mediante LPBE, realizado según lo indicado por el Manual de la OIE, utilizando un antisuero de conejo anti la partícula 140S del virus inactivado y un antisuero de cobayo como anticuerpo secundario. La lectura se realizó a una  $\lambda=450$  nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Los títulos de anticuerpos fueron expresados como el log10 de la inversa de la dilución de suero que otorga el 50% de DO del promedio de absorbancia de los pocillos control sin suero.

#### C.5.- Índice de avidéz (IA) de los anticuerpos contra Fiebre Aftosa mediante ELISA

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

#### C.6.- Respuesta de los isotipos contra A24/Cruzeiro mediante ELISA

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

#### C.7.- Detección de anticuerpos anti toxina alfa, beta y épsilon de *Clostridium perfringens* mediante ELISA.

Para evaluar la respuesta a la vacunación contra la toxina alfa, beta y épsilon de *C. perfringens*

también se utilizaron kits comerciales de ELISA de bloqueo para detectar anticuerpos bovinos específicos contra dichas toxinas (Bio-X Diagnostics - Belgium: BIO K 291/2, BIO K 317 y BIO K 222/2). Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura de DO se realizó a una  $\lambda=450$  nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Los resultados fueron calculados como el porcentaje de inhibición (% inh) de la toxina y se estimó el grado de positividad según las indicaciones del fabricante (Cuadro II) que fueron las siguientes:

Valor calculado	Nivel de positividad
% inh < 20	0
20 <= %inh < 40	+
40 <= %inh < 60	++
60 <= %inh < 80	+++
80 <= %inh	++++

#### C.8.- Análisis estadístico

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

#### **D. Experimento 4 (asociado al objetivo específico 5).**

*Objetivo específico 5: Estandarizar una Droplet digital PCR para la detección del VLB en sangre periférica de animales portadores asintomáticos.*

##### D.1.- Selección de las muestras de ADN

Se seleccionaron al azar 67 muestras de ADN genómico bovino de un Banco de ADN Genómico Holando. Dichas muestras provienen de vacas de tambos comerciales de los Departamentos de Paysandú y Florida, Uruguay. Para la cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Las muestras se

estandarizaron a una concentración final de 30 ng/uL y fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Como controles positivos se utilizaron ADN genómico extraído de la línea celular FLK (*Fetal Lamb Kidney*) persistentemente infectada con VLB y un plásmido pGEM-T recombinante conteniendo un inserto de una sola copia del gen *env* que codifica para la glicoproteína de superficie gp51 (Moratorio et al. 2010), gentilmente cedido por el Dr. Otto Pritsch del Institut Pasteur de Montevideo. El número de copias de provirus fue calculado según el peso molecular del plásmido y con diluciones subsecuentes en base 10 (660 Da por cada bp,  $1\text{ mol} = 6 \times 10^{23}$  moléculas). Como control negativo, se utilizó ADN ovino extraído en las mismas condiciones que las muestras ensayadas.

#### D.2.- Detección de VLB mediante *Nested polymerase chain reaction* (nPCR)

Para la nPCR, se realizaron dos rondas de amplificación de un fragmento del gen *env* del VLB. Los primers utilizados en la primera ronda fueron: env 5032 Forward: 5'-TCT GTG CCA AGT CTC CCA GATA-3'; env 5608 Reverse: 5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA-3' mientras que los utilizados en la segunda ronda (anidada) fueron: env 5099 Forward: 5'- CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T-3'; env 5521 Reverse: 5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G-3'. Se utilizaron protocolos de amplificación descritos previamente que produjeron fragmentos de 598 bp para la primera ronda y de 444 pb para la segunda ronda. Este último producto, esperado en los animales positivos, fue visualizado en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (Fechner et al., 1996).

#### D.3.- Detección y cuantificación de la carga proviral de VLB mediante *Droplet digital PCR* (ddPCR)

Para la ddPCR, se utilizaron las secuencias de primers y sonda FAM descritos previamente por Lew et al. (2004) para amplificar un fragmento del gen *env* de VLB. Las secuencias de los primers fueron: forward 5'-ATC ATG GGC CCT GCT TTT AA-3', reverse 5'-AGG TTC CCA ACA TAT AGC ACA GTC-3' y el de la sonda: 6FAM 5'-TCA AAC GGC ACG GGC CTT CC-3'. Para la realización de la técnica, 2uL de ADN (aproximadamente 60ng) fueron mezclados con 0.6uL de cada primer (10nM) + 0.3uL de sonda FAM (10nM) + Bio-Rad 2x Supermix, y luego emulsificado con el *droplet generator oil* (Bio-Rad, Hercules, CA) usando un QX-200 droplet generator de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las gotas fueron transferidas a una placa de 96 pocillos (Eppendorf, Hauppauge, NY) y luego fueron selladas con un sellador de calor con láminas perforables (PX1™ PCR plate sealer – Bio Rad). La PCR se realizó en un termociclador C1000 TOUCH CYCLER w/96W FSRM (Bio-Rad, Hercules, CA) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , luego 40 ciclos de 15 seg a  $95^{\circ}\text{C}$  y 30 seg a  $59^{\circ}\text{C}$ , y una extensión final de 10 min a  $98^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, luego de la amplificación, la placa de 96 pocillos



fue transferida al QX200 *droplet reader* (Bio-Rad, Hercules, CA) y cada pocillo fue analizado por la presencia de gotitas fluorescentes, de modo de determinar la cantidad de eventos positivos resultantes. Los resultados fueron finalmente analizados en el software QuantaSoft version 1.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA), a través de gráficos de puntos.

#### Cálculo de la carga proviral de VLB en el ADN genómico bovino

Además del resultado cualitativo (negativo/positivo) que nos brinda la ddPCR y que nos permite compararlo con los resultados obtenidos de la nPCR, la carga proviral fue calculada en copias de provirus/uL de ADN para cada muestra utilizando el software QuantaSoft (Bio-Rad, Hercules, CA). Los umbrales detectados fueron determinados manualmente para cada experimento, de acuerdo a los controles negativos y las gotas positivas fueron determinadas por intensidad de fluorescencia. Solo gotitas con un umbral mínimo de amplitud, se contabilizaron como positivos. Los controles negativos se incluyeron en cada experimento, validando el ensayo cuando las mismas no presentaban gotas fluorescentes. Todas las muestras se realizaron por duplicado, y el resultado se expresó como el promedio de las dos mediciones.

#### D.4.- Análisis de los datos

Considerando el resultado de ambas pruebas juntas, se calculó la prevalencia de VLB en las muestras analizadas y tomando como referencia los resultados de la nPCR, se calculó la sensibilidad ( $\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})$ ), especificidad ( $\text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})$ ), valor predictivo positivo – VPP ( $\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos})$ ) y negativo – VPN ( $\text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos})$ ), la precisión y el índice kappa de la técnica ddPCR, utilizando el software Data Analysis Supplement for Excel™ (Office System 2010 for Windows™, Microsoft Corp).

## Resultados generales

### Experimento 1

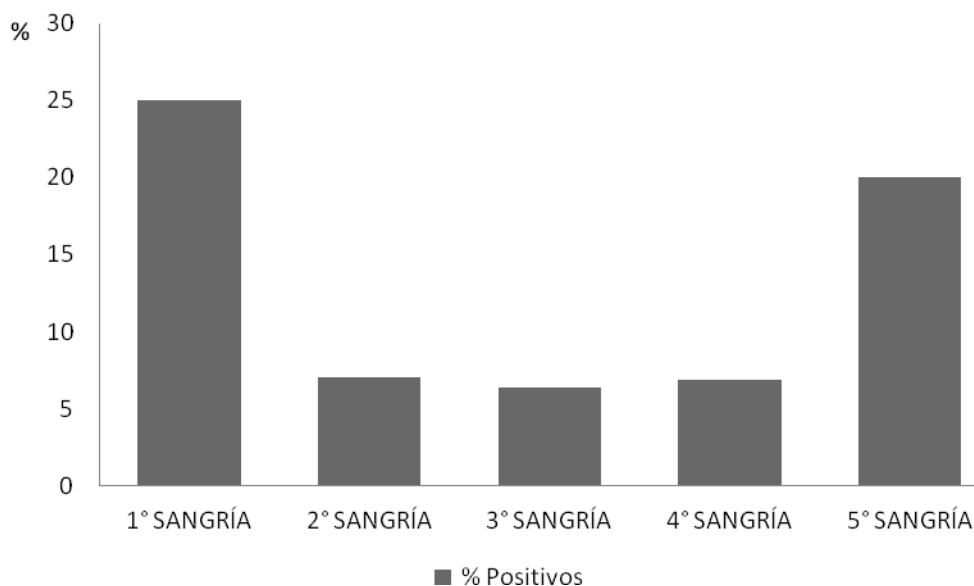
La prevalencia serológica contra VLB a la entrada de las vaquillonas al campo de recría fue de 45% (CI 95%: 40.33% - 49.65%) (Tabla 1). Corrigiendo según la sensibilidad y especificidad de test utilizado, la prevalencia real fue de 45.9% (CI 95%: 41.23% - 50.57%). Por otro lado, la tasa de seroconversión anual fue de 39.8% (CI 95%: 30.5% - 49%) y tasa de transmisión al finalizar el estudio (18 meses) fue de 52,7% (CI 95%: 43.5% - 61.9%). La prevalencia serológica de los animales al egresar del campo de recría para volver a sus campos originales fue de 73.6% (Tabla I). No se encontró asociación entre la edad (diente de leche, dos dientes,  $\geq$  cuatro dientes) y la presencia de anticuerpos anti-VLB ( $p=0,28$ ).

**Tabla I.** Dinámica de la seroconversión contra VLB en bovinos Holando durante 18 meses.

	2011		MAR	2012		2013
	SET	DIC		JUL	DIC	MAR
Seronegativo	214	87	79	73	68	52
Seropositivo	175	29	6	5	5	13
Total	389	116	85	78	73	65
Prevalencia aparente (%)	45	70,5	72,9	75	77,1	81,9
Deserción de animales seropositivos durante el intervalo analizado	-	-	-	-	-	-
Deserción de animales seronegativos durante el intervalo analizado	-	98	3	1	0	3
Tasa de seroconversión (%)	-	25	7,1	6,4	6,8	20,0

La incidencia de la seroconversión fue analizada en cinco sangrías (Fig. 1) y comparada con el manejo y los resultados reproductivos de los animales durante 18 meses. El primer y el último período de muestreo presentaron mayor incidencia de seroconversión (25% y 20%, respectivamente), mientras que en el segundo, tercero y cuarto la seroconversión fue menor (Tabla 1). Durante la primer sangría (incidencia de 25%) los animales se encontraban en cuarentena y aún no habían ingresado al rodeo general, habiéndose realizado en este período la identificación con caravanas, vacunaciones y refuerzos, prueba de la tuberculina, desparasitaciones, suplemento vitamínico inyectable y descorne. En la segunda sangría (incidencia de 7%), el manejo realizado fue la revacunación contra clostridiosis y la extracción de sangre para brucelosis. En la tercer sangría (incidencia de 6.4%) y en la cuarta (incidencia de 6,8%), se realizó el manejo reproductivo con sincronización de celo, inseminación artificial, diagnóstico de gestación por tacto rectal y ecografía,

y vacunación contra leptospirosis. En la quinta sangría, cuando los animales se encontraban próximos a su entrega, no se realizaron maniobras sanitarias y las vaquillonas se encontraban con 7 y 8 meses de gestación, observándose un nuevo pico (20%) en la seroconversión (Fig. 1).



**Figura 1.** Seroconversión contra VLB en vaquillonas Holando confinadas en un sistema de recría durante 18 meses de ensayo.

Se evaluó la ganancia de peso en el período comprendido entre el ingreso de las vaquillonas al campo de recría (Setiembre 2011) y los 12 meses (Setiembre 2012). El promedio de ganancia de peso en el grupo de animales seronegativos fue 164,3 Kg y en el grupo de animales seropositivos fue 160,5 Kg, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla II).

**Tabla II.** Peso vivo de los animales al ingreso (Set-2011) y a los 12 meses (Set-2012) y ganancia de peso entre ambos períodos.

	Parámetros	PV (Set 2011)	PV (Set 2012)	Ganancia de Peso
Seronegativos	Media	185,73	350,03	164,29
	Desvío Estándar	30,61	45,82	34,34
	Error Estándar	3,63	5,43	4,08
	n	71	71	71
Seropositivos	Media	197,79	358,25	160,46
	Desvío Estándar	43,54	50,92	32,44
	Error Estándar	3,15	3,68	2,35
	n	191	191	191

$P > 0,05$

En cuanto a los resultados reproductivos, se evaluaron distintos parámetros de eficiencia reproductiva en dos períodos (Junio-Julio y Noviembre-Diciembre). Analizando los animales de ambos períodos conjuntamente ( $n=251$ ), la presencia de anticuerpos contra VLB no afectó la manifestación de celo ni el número de servicios requeridos por animal ( $p=0,49$  y  $p=0,62$ ,

respectivamente). A su vez, en el grupo de animales seropositivos tampoco existió relación entre el grado de seropositividad (débil, moderado o fuerte) y el número de servicios requeridos ( $p=0,92$ ) o estado de preñez ( $p=0,38$ ). Cuando se comparó la tasa de concepción total de todos los animales en cada periodo, no se encontraron diferencias significativas entre Junio-Julio (80%, 145/180) y Noviembre-Diciembre (76%, 54/71) ( $p=0,42$ ). Cuando los animales fueron agrupados por status serológico contra VLB, la tasa de concepción de los animales seronegativos no fue estadísticamente diferente de los animales seropositivos en el primer periodo de inseminación artificial (Junio-Julio). Sin embargo, en el segundo periodo reproductivo (Noviembre-Diciembre), la tasa de concepción fue significativamente mayor ( $p=0,006$ ) en los animales seronegativos respecto a los animales seropositivos (Tabla III).

**Tabla III.** Serología contra VLB en cada periodo reproductivo vs diagnóstico de gestación

Serología – VLB	Junio-Julio		Noviembre-Diciembre	
	Vaquillonas vacías**	Vaquillonas preñadas	Vaquillonas vacías **	Vaquillonas preñadas
Negativo	9/40 (22.50%)	31/40 (77.50%)	2/30 (6.67%)	28/30 (93.33%)*
Positivo	26/140 (18.57%)	114/140 (81.43%)	26/78 (33.33%)	52/78 (66.67%)*

\*  $p=0.006$ ; \*\* Vacía = no preñada

Por otra parte, cuando se comparó la tasa de concepción según el grado de seropositividad contra VLB, las diferencias no fueron significativas (Tabla IV).

**Tabla IV.** Grado de seropositividad contra VLB en cada periodo reproductivo vs diagnóstico de gestación

Serología – VLB	Junio-Julio		Noviembre-Diciembre	
	Vaquillonas vacías**	Vaquillonas preñadas	Vaquillonas vacías **	Vaquillonas preñadas
Positivo débil	1/16 (6.25%)	15/16 (93.75%)	2/6 (33.33%)	4/6 (66.67%)
Positivo moderado	5/27 (18.52%)	22/27 (81.48%)	8/18 (44.44%)	10/18 (55.56%)
Positivo fuerte	20/97 (20.62%)	77/97 (79.38%)	16/54 (29.63%)	38/54 (70.37%)

$p>0.05$ ; \*\* Vacía = no preñada

Al analizar el status serológico de los toros utilizados para el repaso, se encontró que el 57% era seropositivo para VLB. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje total de preñez por toros o por inseminación artificial. Finalmente, el número de servicios total que se necesitó en ambos periodos, no varió significativamente ( $p=0,22$ ) entre los animales seropositivos y seronegativos. En el periodo Junio-Julio, las vaquillonas seronegativas y seropositivas requirieron 1,65 y 1,64 servicios, respectivamente para lograr una gestación ( $p=0,61$ ), mientras que en el periodo Noviembre-Diciembre, la cantidad de servicios necesarios fue 1,46 y 2,35 para seronegativas y seropositivas, respectivamente.

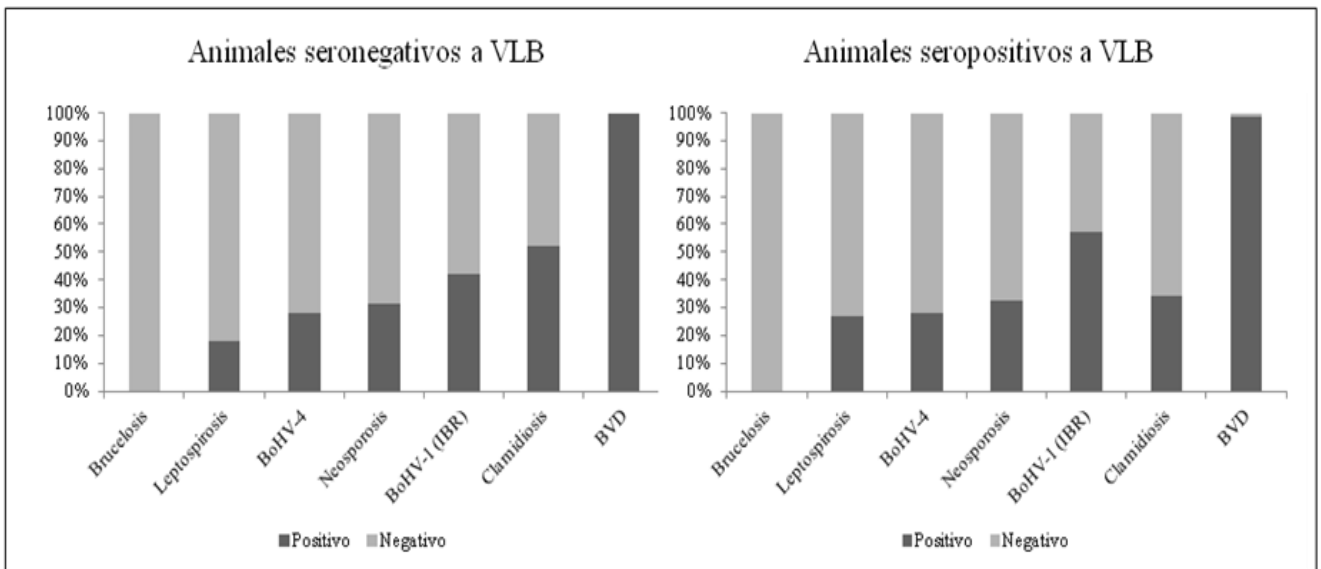
## Experimento 2

En este experimento se analizaron 655 sueros de vacas lecheras en producción, estudiándose posibles asociaciones entre VLB y las principales enfermedades de la reproducción (IBR, BVD, Leptospirosis, Brucelosis, Neosporosis y Clamidiosis). La prevalencia serológica encontrada en esta población para cada una de las enfermedades estudiadas se resume en la Tabla V.

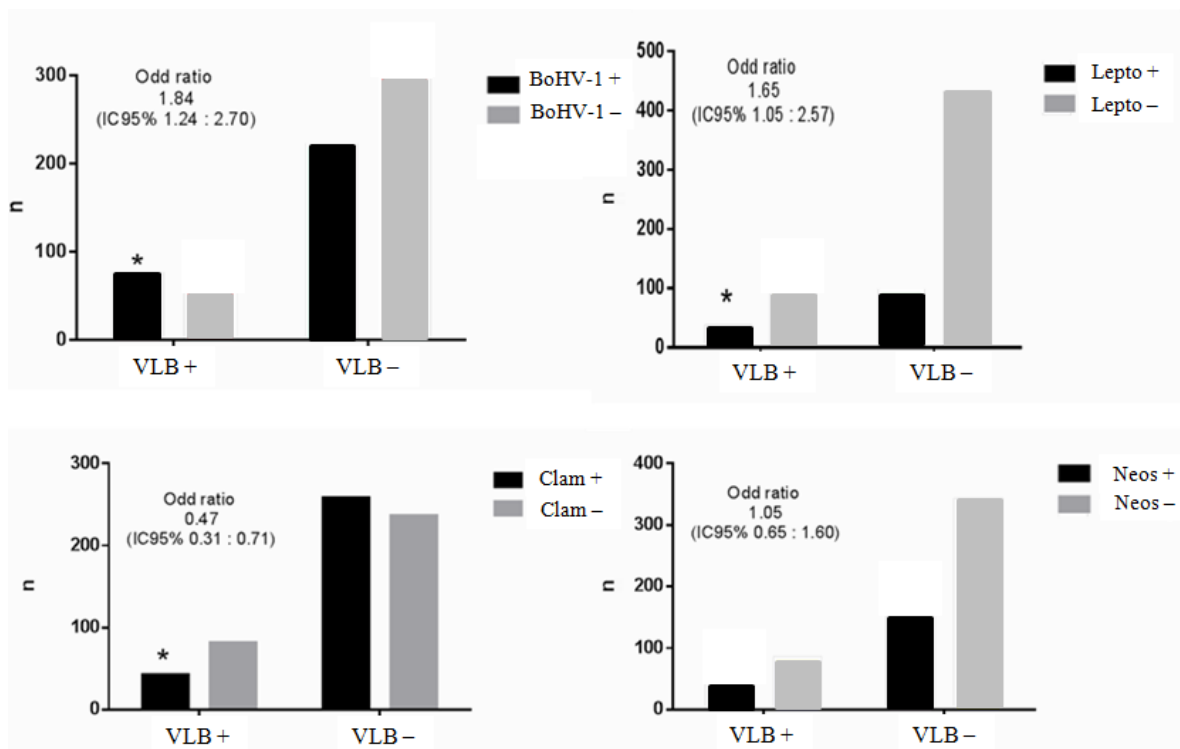
**Tabla V.** Prevalencia serológica para cada enfermedad encontrada en la población Holando estudiada

Enfermedad	Positivos (n)	Negativos (n)	%
Brucelosis	0	655	0
Leptospirosis	130	525	19,8
VLB	131	524	20
BoHV-4	155	395	28,2
Neosporosis	196	424	31,6
BoHV-1 (IBR)	296	359	45,2
Clamidiosis	300	317	48,6
BVD	651	4	99,4

La principal enfermedad infecciosa diagnosticada serológicamente fue BVD, mientras que ningún animal reaccionó positivamente a la técnica *screening* de Rosa de Bengala para Brucelosis. Cuando se relacionó la seropositividad contra VLB con las enfermedades reproductivas estudiadas, se pudo observar que algunas enfermedades estaban relacionadas entre sí (Fig. 2). Se encontró una asociación positiva entre VLB/BoHV-1 y VLB/Leptospirosis con un *Odds ratio* de 1.84 (IC 95%: 1,24 – 2,70) y 1,65 (IC 95%: 1,05 – 2,57) respectivamente. Por otro lado, se observó una asociación negativa entre VLB/Clamidiosis con un *Odds ratio* de 0,47 (IC 95%: 0,31- 0,71) (Fig. 3). Para neosporosis la asociación no fue significativa, mientras que para BVD y brucelosis no se pudo calcular, debido a que en el primer caso el 99% de los animales era seropositivo, y para brucelosis el 100% era seronegativo.



**Figura 2.** Seropositividad contra las principales enfermedades reproductivas en vaquillonas Holando según el status contra VLB.



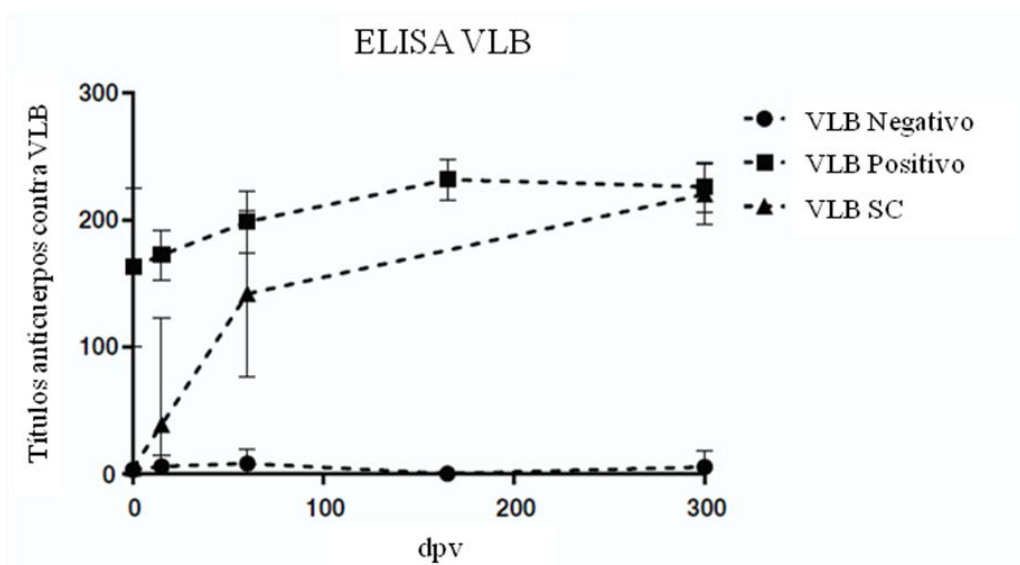
**Figura 3.** Odds Ratio entre VLB/BoHV-1(BoHV-1), VLB/Leptospirosis (Lepto), VLB/Clamidiosis (Clam) y VLB/Neosporosis (Neos). \*  $p < 0,05$ .

### Experimento 3

#### Ensayo VLB y Fiebre Aftosa

##### *Anticuerpos totales contra VLB y resultados de los hemogramas*

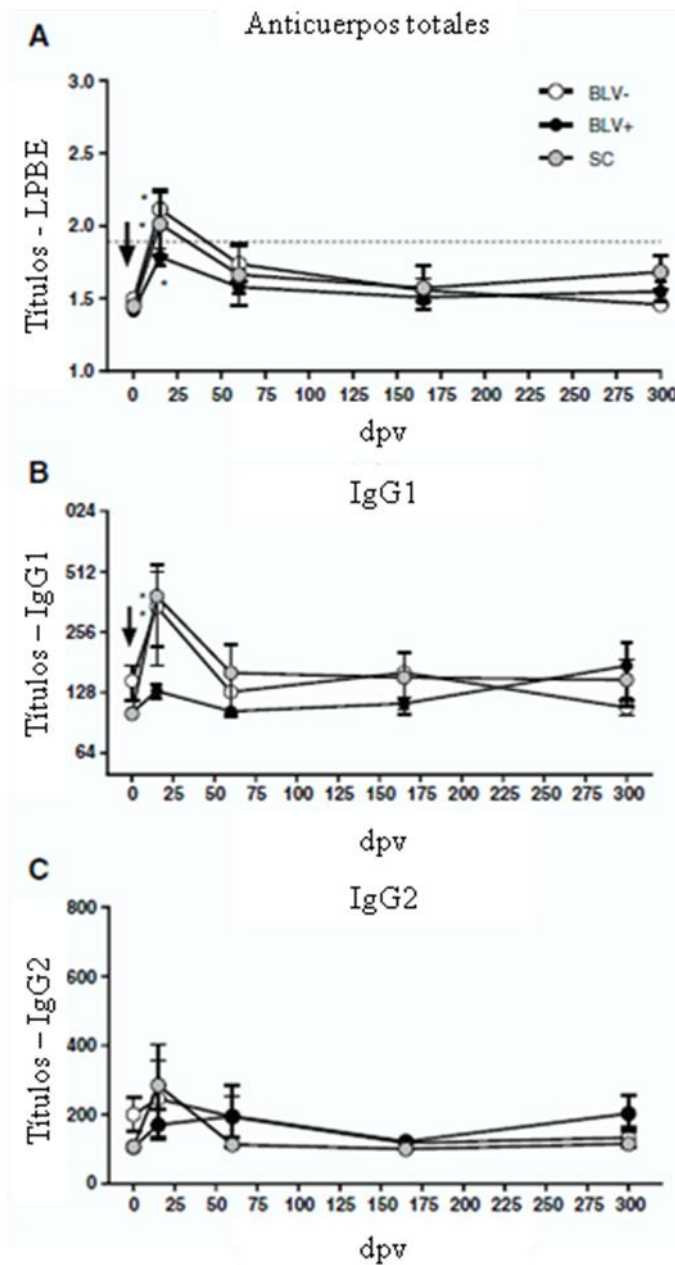
Los grupos VLB + y VLB - permanecieron seropositivos y seronegativos, respectivamente durante todo el experimento, mientras que los animales del grupo SC, seroconvirtieron durante el ensayo entre los días 15 y 150 del experimento (Fig. 4). Ningún animal presentó leucocitosis o linfocitosis al comienzo del experimento, lo que fue confirmado por los hemogramas en leucocitos de sangre periférica (datos no mostrados).



**Figura 4.** Cinética de los títulos de anticuerpos contra VLB mediante ELISA en los distintos grupos de vaquillonas Holando a lo largo del ensayo. Para cada media se muestra el error estándar (SEM). El grupo VLB - y VLB + permanecieron negativos y positivos durante todo el ensayo, mientras que los animales del grupo “VLB SC” fueron negativos al día 0, pero luego seroconvirtieron.

##### *Anticuerpos totales contra el virus de la Fiebre Aftosa*

La cinética de las curvas de anticuerpos analizados por LPBE fue similar hasta el día 300 entre los tres grupos del ensayo (Fig. 5A). Los títulos de anticuerpos totales aumentaron después de la vacunación en todos los animales y esta diferencia fue significativa a los 15 días post vacunación (dpv) para cada grupo, en comparación con los títulos medidos al día 0 ( $p < 0,01$ ). Luego de ese período, los títulos de anticuerpos disminuyeron y permanecieron en niveles bajos hasta el final del experimento, manteniéndose por debajo del 75% del PPE después de los 60 dpv (Fig. 5A). Los títulos de anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa por LPBE a los 15 dpv no difirieron estadísticamente entre los grupos, aunque fueron mayores en el grupo VLB -, en comparación con el grupo VLB + (Fig. 5A).



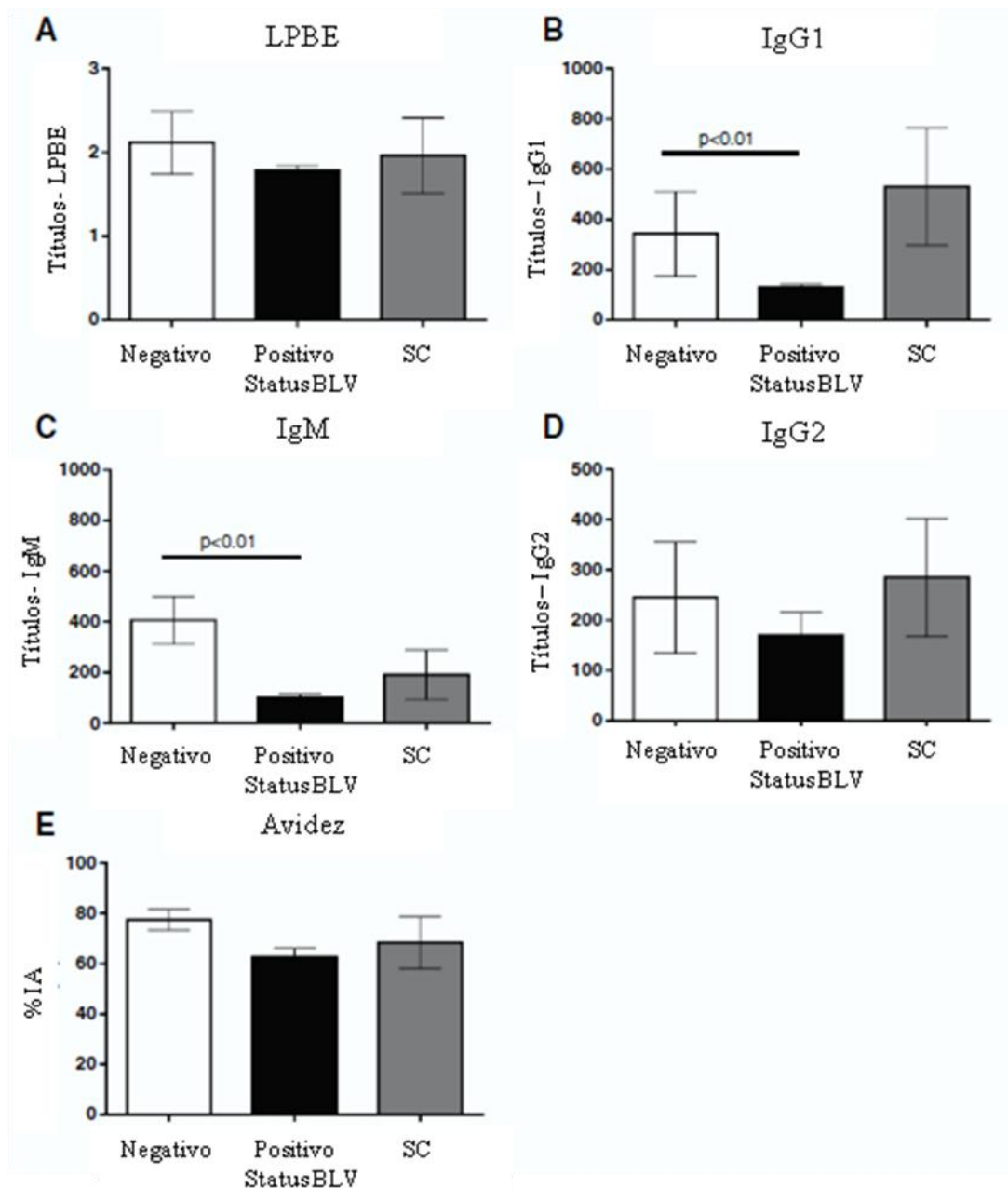
**Figura 5.** Cinética de los títulos de anticuerpos contra la cepa A/24 Cruzeiro en el grupo VLB negativo (VLB - ; n= 10; círculos blancos), VLB positivo (VLB +; n= 20; círculos negros) y grupo seroconvertido (SC; n= 5; círculos gris). Para cada media se muestra el error estándar (SEM). A) Títulos medidos por ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE). Título de 1,90 (línea punteada) está relacionado con la protección contra A24/Cruzeiro (EPP 75%). B) IgG1 y C) IgG2 fueron determinados mediante ELISA indirecto. Todos los animales recibieron una sola dosis comercial de vacuna bivalente contra Fiebre Aftosa al 0 dpv. Los títulos fueron significativamente mayores en todos los grupos al 0 dpv comparados con el 15 dpv del mismo grupo ( $p < 0,01$ ).

Por otro lado, el índice de avidéz de los anticuerpos totales fue analizado al 15 dpv. Si bien hubo una tendencia aparente de una mayor avidéz en los anticuerpos totales contra Fiebre Aftosa en el grupo VLB -, estas diferencias no fueron significativas (Fig. 6E).

#### *Isotipos de anticuerpos específicos contra Fiebre Aftosa*



Se analizaron los isotipos de anticuerpos y su concentración luego de la vacunación contra Fiebre Aftosa, con el fin de verificar la producción de IgM (respuesta primaria), así como el cambio de isotipos y la producción de IgG1 e IgG2, evidenciando la colaboración de las células T CD4+ en la respuesta inmune frente a la vacunación contra Fiebre Aftosa. Se encontró un aumento importante en los títulos de IgM a los 15 dpv en todos los grupos del ensayo, con una diferencia significativamente mayor en los animales VLB – en comparación con los VLB+ ( $p < 0,01$ ). Por otro lado, también se encontró una diferencia significativa en los títulos de IgG1 a los 15 dpv, con una media del título de 287,1 y 127,8 en los grupos VLB – y VLB+, respectivamente (Fig. 5B y 6B). Luego de ese periodo, y durante la duración del ensayo, no se encontraron diferencias para este isotipo entre los grupos. En lo que refiere a la producción de IgG2, los niveles no variaron significativamente entre los grupos a lo largo del experimento, a pesar de encontrarse una mayor respuesta en los animales VLB – a los 15 dpv, con un título medio de 229,3 comparado con 174,6 en el grupo VLB + (Fig. 5C y 6D).



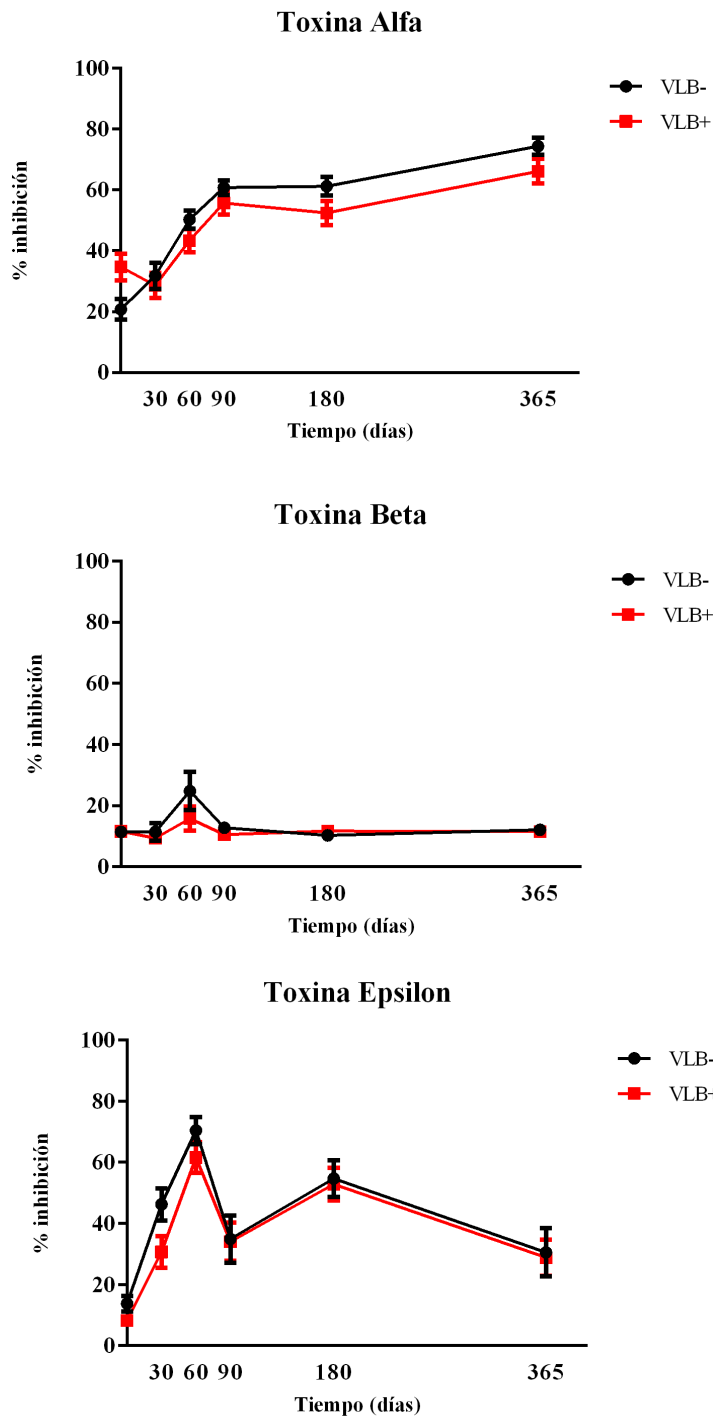
**Figura 6.** Comparación a los 15 días post vacunación de anticuerpos totales (A), IgG1 (B), IgM (C), IgG2 (D) e índice de avidéz (IA) (E) contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa en el grupo VLB negativo (VLB - ; n= 10; círculos blancos), VLB positivo (VLB +; n= 20; círculos negros) y grupo seroconvertido (SC; n= 5; círculos gris). Para cada media se muestra el error estándar (SEM). Todos los animales recibieron una sola dosis comercial de vacuna bivalente contra Fiebre Aftosa al 0 dpv. Los títulos de IgM e IgG1 fueron significativamente mayores en VLB - comparados VLB + ( $p < 0.01$ ).

### Ensayo VLB y Clostridiosis

#### *Anticuerpos totales anti- Clostridium perfringens por ELISA*

La respuesta a la vacunación contra Clostridios en bovinos infectados con VLB, se evaluó mediante la determinación de anticuerpos totales contra las toxinas alfa, beta y épsilon de *C. perfringens* mediante el uso de kits de ELISA de bloqueo comerciales. Los títulos de anticuerpos fueron expresados en “porcentaje de inhibición” de cada toxina específicamente. Al inicio del experimento

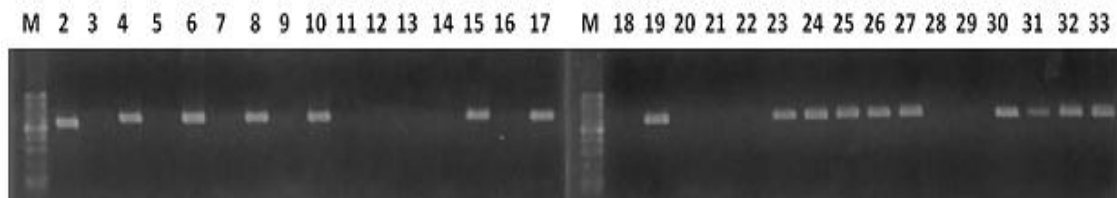
(día 0), si bien los animales no habían sido vacunados previamente contra esta enfermedad, tenían niveles bajos de anticuerpos contra las tres toxinas; sin embargo, en base a la interpretación de los resultados propuesta por el fabricante (Bio-x Diagnostics - Belgium), son considerados “niveles 0” de positividad. Luego de la primoinmunización con la vacuna polivalente comercial, se evidenció un aumento claro en el título de anticuerpos al 30 dpv únicamente contra la toxina épsilon. En el grupo VLB – el título de anticuerpos contra esta toxina fue mayor (nivel de positividad ++) que el grupo VLB + (nivel de positividad +). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ). Para las demás toxinas (alfa y beta), el efecto de la primovacunación a los 30 dpv, no fue claro según los resultados obtenidos por ELISA. Por otro lado, luego de la revacunación (día 60), se encontró un aumento significativo de los anticuerpos contra las tres toxinas analizadas con niveles de positividad entre ++ y +++ para las toxinas alfa y épsilon. En el caso de la toxina beta, el grupo VLB – obtuvo un nivel de positividad +, mientras que el grupo VLB + se mantuvo en el nivel de positividad 0, según el fabricante del kit. A pesar de esa mayor respuesta a favor del grupo VLB –, esas diferencias no fueron significativas ( $p>0.05$ ). Luego de ese periodo, la cinética en los títulos de anticuerpos contra las tres toxinas, tuvo un comportamiento diferente en ambos grupos (VLB+ y VLB –). En el caso de los anticuerpos contra la toxina alfa, los títulos continuaron aumentando hasta el día 365. Para el caso de la toxina beta, los títulos cayeron hacia el día 90 y se mantuvieron bajos en niveles 0 de positividad hasta el final del experimento. Finalmente, para la toxina épsilon, luego de disminuir hacia el día 90, se evidenció un aumento en los títulos de anticuerpos al día 180, que luego disminuyó hacia el final del experimento (Fig. 7).



**Figura 7.** Cinética de los títulos de anticuerpos contra las toxinas alfa, beta y épsilon en animales seronegativos y seropositivos a VLB analizados mediante ELISA de bloqueo comercial (Bio-X diagnostics Belgium). Los animales fueron vacunados el día 0 y revacunados el día 30 con una vacuna comercial polivalente conteniendo, además de estas tres toxinas, otros clostridios. Los títulos fueron expresados en porcentaje de inhibición para cada toxina.

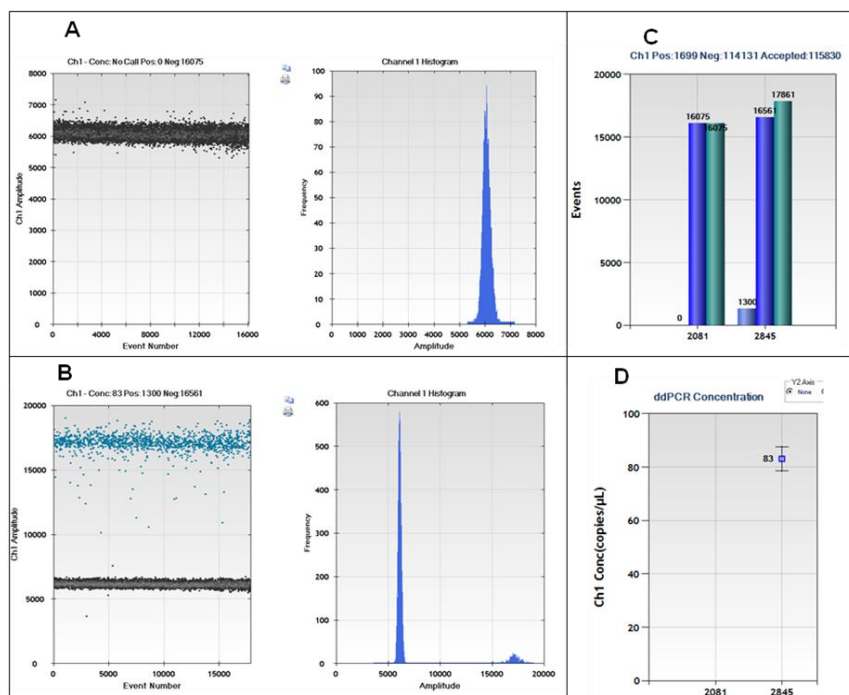
## Experimento 4

La Figura 8 muestra los resultados de la detección de un segmento del gen env de VLB mediante nPCR. El 62,7 % de las muestras analizadas (42/67) resultaron positivas para VLB (32 en la primera ronda y 10 en la segunda ronda de PCR).



**Figura 8.** Ejemplo de muestras visualizadas en el gel de agarosa luego de amplificadas por la nPCR, M: marcador de peso molecular 100bp, Muestras positivas: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 17,19,23, 24, 25, 26, 27,30, 31, 32, 33 muestran el amplicón de 444bp producto de la amplificación de un segmento del gen env del VLB. Muestras 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 22, 28 y 29 negativas a VLB.

En la Figura 9 se muestran los resultados cualitativos obtenidos por ddPCR. Sesenta muestras fueron positivas para VLB, presentando al menos una gota fluorescente. Por lo tanto, sobre el total de muestras analizadas (n=67), se encontró una prevalencia de 89.5% de VLB por esta técnica. Por otro lado, cuando se compararon ambas técnicas, 18 de las 25 muestras que fueron negativas por nPCR, resultaron positivas por ddPCR, es decir, la ddPCR detectó un 72% más de muestras positivas que la nPCR.



**Figura 9.** Ejemplo de salida de datos del instrumento de ddPCR visualizados en el software Quantasoft. Los gráficos de dispersión unidimensionales muestran un ensayo optimizado con una clara distinción entre las gotas positivas (puntos azules), negativas (puntos grises) y distintas poblaciones en los histogramas - muestra negativa (A) y muestra positiva (B). El número de gotas positivas, negativas y totales (C) es utilizado para el cálculo de la concentración de provirus

(copias/uL) según la distribución de Poisson (D).

Respecto a la cuantificación de la carga proviral, en las muestras que fueron positivas para VLB por ddPCR (60/67) se detectó una gran variabilidad en el número de copias provirales, observándose un rango entre 12 y 49.500 copias provirales/uL de ADN genómico, con valores de media y mediana de 1742 y 111 copias/uL respectivamente. En aquellas muestras que fueron positivas por ddPCR y negativas por nPCR (18/25), la variación en el número de copias provirales no solamente fue marcadamente menor (rango: 12 a 48 copias/uL), sino que el nivel de carga proviral observado fue muy bajo, con una media de 23 y una mediana de 21 copias/uL. Al comparar la carga proviral en las muestras positivas para ambas pruebas, se observó un amplio rango en el número de copias del provirus (10 a 49500 copias/uL), con una media de 2479 y una mediana de 554 copias/uL. Sin embargo, de las 60 muestras positivas por ddPCR, un total de 26 presentaron valores por debajo de 50 copias provirales/uL, donde tan solo 8 de estas (30%), fueron detectadas por nPCR.

Se construyó una tabla de contingencia (Tabla VI) con el fin de comparar los resultados de ambas pruebas y determinar la eficiencia relativa de las mismas. Tomando como prueba de referencia la nPCR para el diagnóstico de animales infectados con VLB, se estimó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 28% para la ddPCR. El nivel de concordancia entre ambas técnicas estimado por el índice kappa, fue aceptable ( $\kappa = 0.328$ ) según la tabla de Landis y Koch (1977).

**Tabla VI.** Resultados obtenidos por nested PCR (nPCR) y Droplet digital PCR (ddPCR) y análisis estadísticos de los resultados.

<b>Digital PCR</b>	<b>Nested PCR</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	
<b>Positivos</b>	42	18	60
<b>Negativos</b>	0	7	7
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>25</b>	<b>67</b>

Sensibilidad (%): 100 (CI 95%: 91.59% - 100.00%)

Especificidad (%): 28 (CI 95%: 12.07% - 49.39%)

Valor predictivo positivo (%): 70 (CI 95%: 56.79% - 81.15%)

Valor predictivo negativo (%): 100 (CI 95%: 59.04% - 100.00%)

Prevalencia real (%): 62.7 (CI 95%: 51.1% - 74.3%)

Prevalencia aparente (%): 89.6 (CI 95%: 82.2% - 96.9%)

Índice kappa ( $\kappa$ ): 0.328

## **Discusión general y conclusiones**

El virus de la Leucosis bovina es uno de los principales patógenos que afecta la lechería a nivel mundial. En Uruguay, este virus está ampliamente difundido en bovinos de leche y cobra gran importancia sobre todo por la exportación de vaquillonas en pie. Sin embargo, también se sabe que la infección causa pérdidas productivas directa e indirectamente, como por ejemplo una disminución en la producción láctea (Bartlett et al., 2014), un desbalance a nivel de la respuesta inmune (Kabeya et al., 2001; Erskine et al., 2011), así como posiblemente también un impacto en la performance reproductiva (VanLeeuwen et al., 2010). Si bien es una enfermedad antigua y que se ha estudiado bastante, aún se discute el real impacto que produce la presencia del virus en un rodeo, habiendo investigaciones que concluyen que VLB no causa pérdidas como las antes mencionada.

Hasta la fecha son muy escasas las investigaciones publicadas en Uruguay respecto a este virus y su importancia a nivel productivo. Básicamente, se han limitado a estudios de prevalencia de la enfermedad en ganado lechero (Furtado et al., 2012). Por lo tanto, el objetivo de esta tesis doctoral fue abordar algunos aspectos de la infección en su forma subclínica, observando el posible impacto que pudiera tener el virus a nivel productivo/reproductivo y/o sanitario. Además, se propuso el desarrollo de una nueva herramienta para el diagnóstico precoz de la infección, basado en una PCR de última generación. En este sentido, y fruto de los resultados obtenidos, se consolidó la línea de investigación en Leucosis bovina en la Facultad de Veterinaria de la UdelaR, que pretende profundizar el conocimiento sobre esta virosis, así como relacionarla con otros virus de interés para la producción, como ser el virus de la Diarrea Viral bovina (BVD) y el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina (IBR).

En cuanto a los resultados obtenidos en el Experimento 1, donde se evaluó la transmisión del virus en el campo de cría más importante del país y se asoció la infección con la performance reproductiva de las vaquillonas, los resultados fueron muy interesantes y generaron aportes que desprendieron nuevas hipótesis que deberán ser probadas en futuros experimentos.

Por un lado, se evidenció un alto grado de positividad a VLB en vaquillonas Holando jóvenes provenientes de la cuenca lechera sur del país (Puentes et al., 2016a). Estos animales fueron chequeados cuando tenían aproximadamente 8 meses de edad y ya había un 45% de seropositivas en ese momento. Si bien no existían antecedentes en Uruguay para comparar con estos resultados, se esperaba encontrar un porcentaje de infectados bastante menor, basándonos principalmente en experimentos similares realizados en la región, como los llevados a cabo recientemente en Argentina, que encuentran un 11% y 17% de animales seropositivos a los 9 y 18 meses de edad (Gutiérrez et al., 2011). Estos datos son relevantes para el país no solo porque demuestran una alta difusión de la infección en esa categoría de animales, sí no porque además es importante resaltar



que los productores que utilizan el campo de cría en cuestión, no participan de la exportación de vaquillonas libres de VLB, lo que descarta la posible selección de animales seropositivos en ese comercio de animales, mediante la venta de los seronegativos al virus.

Por otra parte, se pudo determinar la tasa de transmisión viral anual mediante la aparición de nuevos seropositivos, que fue de 39.8%. Lo importante para resaltar en estos resultados, es que teniendo en cuenta que la principal vía de transmisión del virus propuesta es la horizontal mediante iatrogenia (Hopkins & Digiacomio, 1997), el manejo sanitario que realiza el campo para minimizar ese contagio, mediante la desinfección de agujas entre cada animal, no está siendo efectivo al menos para este virus. De todos modos, no se puede excluir o minimizar el posible rol que pueden tener los insectos (especialmente tábanos) o el contacto directo entre animales en la transmisión horizontal en este caso (Ooshiro et al., 2013).

Asimismo, y también vinculado al Experimento 1 de esta tesis, se evaluó el impacto del virus en la performance reproductiva de las vaquillonas durante dos periodos (Puentes et al., 2016a). El principal resultado referente a este punto, fue que encontramos que los animales seropositivos a VLB tuvieron una tasa de concepción 26% más baja que los animales seronegativos en uno de los periodos reproductivos. Estos resultados sí bien son muy alarmantes, no se deben considerar como una verdad absoluta en este momento, si no como un hallazgo que debe profundizarse y analizarse en futuros experimentos similares, teniendo en cuenta, sobre todo, que hasta la fecha no se conoce con claridad si este virus puede afectar directa o indirectamente la performance reproductiva. Algunas investigaciones previas apuntan en este sentido, demostrando un mayor riesgo de prolongar el intervalo interparto en la primera lactación y en una menor tasa de concepción lograda cuando las vacas son portadoras de VLB (Vanleeuwen et al., 2010). Sin embargo, y contrario a esto, otros autores no encuentran asociaciones directas en este sentido (Kale et al., 2007).

La hipótesis por la cual VLB podría interferir con la gestación en bovinos portadores asintomáticos de la infección no es clara y no fue el foco de investigación en este experimento. Algunos aspectos que podrían ser explorados como posibles explicaciones a este hallazgo podrían ser la inmunomodulación o desregulación inmunológica que induce VLB una vez que infecta al bovino, pudiendo de algún modo interferir con la tolerancia fetal que existe a nivel uterino (Bauersachs & Wolf, 2013). Por otro lado, y también asociado a la inmunomodulación que ejerce VLB sobre las defensas del animal, es posible que la infección con este virus predisponga o disminuya la resistencia a la infección contra otros patógenos que están directamente asociados con reabsorción embrionarias o abortos en bovinos. Estas son hipótesis que deberían ser exploradas en futuros ensayos para explicar los hallazgos obtenidos en este experimento.

En cuanto a los resultados del Experimento 2, referente a la asociación de VLB con la

seropositividad contra enfermedades de la reproducción, los principales resultados demostraron una asociación positiva entre estar infectado con VLB y tener anticuerpos contra BoHV-1 (IBR) (*Odds ratio* 1,84) y Leptospirosis (*Odds ratio* 1,65). Estos hallazgos son muy importantes, teniendo en cuenta que se trata de dos de las principales enfermedades infecciosas de la reproducción en bovinos y podrían explicar en cierta forma lo que se discutió en el párrafo anterior, vinculado a como VLB podría provocar una disminución en la tasa de concepción. En este caso, al encontrarse una asociación positiva entre estas enfermedades, el rol de VLB en la reproducción podría ser indirecto, facilitando el ingreso de otros patógenos (BoHV-1 o Leptospirosis como en este caso) o disminuyendo los mecanismos inmunológicos protectivos. En ese sentido, no existen publicaciones similares que permitan comparar o apoyar estos resultados. Sin embargo, Pyeon et al. (2000) revelan una posible asociación de VLB con BoHV-1 y *Brucella abortus*. En sus experimentos, encuentran que estos patógenos, activan la expresión de ARN mensajeros de la enzima COX-2 en bovinos. Esta enzima está involucrada en la producción de Prostaglandinas E2 (PGE-2) por los macrófagos, que se sabe que promueve la expresión de ARN mensajeros de los genes Tax y Pol de VLB. Estos ensayos *in vitro*, sumados a los resultados a campo de esta tesis doctoral, deben ser profundizados en futuros experimentos, para conocer con precisión las interacciones entre VLB y otros patógenos de interés productivo en bovinos.

Por otra parte, cuando se evaluó la inmunidad contra Fiebre Aftosa en vaquillonas infectadas con VLB, los resultados también arrojaron algunos datos interesantes (Puentes et al., 2016b). Es importante señalar que Fiebre Aftosa es una enfermedad bajo campaña oficial en el Uruguay, y por lo tanto el protocolo de inmunización que se utilizó fue el establecido por la reglamentación vigente. Esto quiere decir que se utilizó una única dosis de vacuna bivalente comercial durante el período reglamentario. Los principales resultados de este experimento demostraron que cuando las vaquillonas estaban infectadas con VLB, produjeron menor cantidad de IgM e IgG1 a los 15 dpv que los animales seronegativos. Esto es relevante si tenemos en cuenta que IgG1 está relacionada con la protección contra Fiebre Aftosa en animales vacunados (Capozzo et al., 1997; Pega et al., 2015) mientras que IgM es importante durante la primoinfección en animales inmunológicamente vírgenes (Pega et al., 2013). La explicación de estas diferencias podría estar dada por la inmunomodulación de la respuesta de las células TCD4 que induce VLB en los animales infectados, modificando el perfil de la respuesta inmune Th1/Th2 a medida que progresa la infección (Kabeya et al., 2001). La expresión de IgG1 está positivamente regulada por IL-4 y la de IgG2 por la expresión de IFN- $\gamma$  (Estes & Brown, 2002), lo que podría relacionarse con esta diferencia de isotipos encontrada contra la cepa A24/Cruzeiro de Fiebre Aftosa en animales libres e infectados con VLB. La importancia práctica en este caso, podría estar asociada a las funciones biológicas de las inmunoglobulinas. Cada subclase dentro de un mismo isotipo difiere en algunos aminoácidos, lo que modifica las propiedades físicas de la molécula así como la movilidad de la misma, pudiendo

determinar diferencias a nivel de la actividad biológica. IgG1 constituye cerca del 50% de las IgG en el suero de los bovinos y, a diferencia de otras especies, en rumiantes (especialmente bovinos) IgG1 es la mayor inmunoglobulina secretoria en calostro y leche (Estes & Brown, 2002). Ensayos a campo han demostrado la importancia de esta subclase de inmunoglobulina para la protección contra Fiebre Aftosa en bovinos, encontrándose que animales con un marcado aumento de IgG1 en sangre luego de una inmunización con la cepa A24/Cruzeiro inactivada, usualmente no presentan signos clínicos luego del desafío (Mulcahy et al., 1990). Erskine et al., (2011), en ensayos similares, también demostraron un cambio en el perfil de inmunoglobulinas producidos luego de la vacunación contra *E. coli* en animales infectados con VLB, lo que sostiene aun más la hipótesis de que este virus puede interferir con la vacunación a campo contra patógenos de interés productivo.

En cuanto a la respuesta contra Clostridiosis, la misma fue analizada utilizando tres kits de ELISA de bloqueo. Algunos autores han propuesto la viabilidad de utilizar la técnica de ELISA para evaluar la respuesta serológica contra clostridios como alternativa a los ensayos biológicos (Krt, 1999). Sin embargo, no existen suficientes evidencias que asocien los títulos de anticuerpos mediante ELISA y la protección *in vivo* contra la enfermedad. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis deben ser profundizados y comparados con ensayos a campo con desafío o con técnicas como la seroneutralización *in vitro* que son utilizadas más a menudo para este tipo de experimentos (Souza et al., 2010; Salvarini et al., 2010; 2013). Considerando lo dicho anteriormente, los kits de ELISA fueron utilizados como herramienta disponible cuya utilidad debe ser demostrada en un futuro cercano. Los resultados obtenidos permitieron observar un aumento del título de anticuerpos luego de la vacunación contra las tres toxinas analizadas. En los tres casos, la cinética en la producción de anticuerpos varió ampliamente. Incluso en el caso de las toxinas alfa y épsilon, se pudo observar un aumento en el título de anticuerpos que no estuvo asociado a ninguna inmunización programada (Fig. 7). Esto pudo deberse a inmunizaciones naturales ocurridas en el transcurso del experimento, teniendo en cuenta que el género *Clostridium* está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el tracto intestinal de los animales, siendo el *C. perfringens* una de las especies más comunes en bovinos en nuestro país. Por otro lado, cuando se asoció la respuesta a la vacunación en función del status contra VLB, no se encontraron diferencias entre ambos grupos. Si bien se observó una respuesta de anticuerpos levemente superior en el grupo VLB – contra las tres toxinas, estas diferencias no fueron significativas.

Desde el punto de vista diagnóstico y teniendo en cuenta los resultados del Experimento 1, donde se evidenció un aumento importante de seropositivos a VLB luego de 18 meses de ensayo y los resultados de otros investigadores (Gutierrez et al., 2011) que demuestran un aumento de la infección a pesar del manejo tendiente a evitar la propagación viral por iatrogenia, se cuestionó la sensibilidad de los test diagnósticos disponibles y avalados por la OIE. En este caso, se focalizó este

ensayo en la comparación de la detección molecular del provirus en sangre periférica por nPCR y una nueva técnica molecular, la ddPCR (Puentes et al., 2016c). Conocida también como la “tercera generación” de PCR, es una nueva herramienta para la detección y cuantificación viral absoluta que combina fundamentos de la PCR convencional y de la *Real Time* PCR. Presenta ventajas importantes sobre ambas técnicas lo que ha llevado a que se estén comenzando a utilizar en diversos países con resultados interesantes y muy prometedores (Brunetto et al., 2014). La qPCR, si bien es una técnica muy útil para cuantificación de ADN, tiene limitaciones inherentes que pueden impedir la precisa y exacta cuantificación de la carga viral (Hayden et al., 2013). Además, un enfoque indirecto para determinar la cantidad de ADN por medio de una curva estándar, no es lo más adecuado para la cuantificación de carga viral, especialmente por la consistencia y fiabilidad que son aspectos esenciales para la detección de umbrales y cambios biológicamente significativos (Brunetto et al., 2014). En este sentido, se pretendió comunicar la estandarización por primera vez de la ddPCR para la detección de VLB en forma de provirus en animales infectados naturalmente. La técnica utilizada, fue comparada con la nPCR, única prueba molecular de referencia para la OIE. Los resultados obtenidos de 67 animales, demostraron que de las 25 muestras negativas por nPCR, 18 fueron positivas por ddPCR (Puentes et al., 2016c). La sensibilidad de la ddPCR ha sido demostrada con otros virus de la familia de VLB, como ser HIV y HTLV (Brunetto et al., 2014; Trypsteen et al., 2016). Siendo esta la primera comunicación de diagnóstico de VLB mediante ddPCR, futuros ensayos deben ser realizados para confirmar estos hallazgos y además comparar con la otra técnica molecular disponible (*Real Time* PCR), que si bien no está avalada por la OIE, puede permitir otro tipo de comparación, en cuanto la cuantificación de la carga proviral entre ambas técnicas.

Finalmente, el desarrollo de los ensayos de la presente Tesis Doctoral, ha permitido consolidar la formación de RRHH a varios niveles. Por un lado, el Experimento 1 permitió la realización de la Tesis de Grado de 3 estudiantes de Veterinaria, que se recibieron en el año 2014. Asimismo, actualmente está en curso una Tesis de Maestría en Salud Animal (Programa de Posgrados, Facultad de Veterinaria, UdelaR) que se desarrolla con parte del Experimento 3. También, y a raíz de los resultados obtenidos en la presente Tesis, a fines de 2015 se logró la financiación de un Proyecto sobre Leucosis bovina por el Fondo Sectorial de Salud Animal de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FSSA-ANII) por un monto de 140.000 dólares.

## **Perspectivas**

Desde hace muchos años, posiblemente se han subestimado las pérdidas que produce la infección con VLB en los rodeos bovinos tanto en Uruguay como diversos países del mundo. Básicamente se ha focalizado la atención en las pérdidas producidas por las restricciones de mercados de países compradores de animales en pie, desconociendo muchas veces las pérdidas indirectas que produce la infección en un rodeo que en definitiva puede causar un impacto económico significativo. En ese sentido, se ha consolidado una línea de investigación en VLB en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, que busca generar conocimientos sobre algunos aspectos no resueltos y discutidos a nivel internacional sobre este virus. Por lo tanto, y tomando como punto de partida los resultados de esta tesis doctoral, las perspectivas futuras apuntan a promover principalmente investigaciones vinculadas al rol de VLB en los sistemas de cría y el impacto en la respuesta a la vacunación contra patógenos de interés productivo. Paralelo a esto, y vinculado a la ddPCR como herramienta diagnóstica, se abre un nuevo horizonte que estará centrado en determinar el verdadero *status* de la infección o al menos mejorar la capacidad de detección del virus que hoy se obtiene con las herramientas disponibles. Finalmente, y con proyección a largo plazo, es imprescindible la generación de una masa crítica de profesionales veterinarios y afines, que puedan dar continuidad a este y otros problemas sanitarios de nuestra producción.

## **Referencias bibliográficas**

1. Aida Y, Miyasaka M, Okada K, Onuma M, Kogure S, Suzuky M, Minoprio P, Levy D, Ikawa Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 50:1946-1951.
2. Azevedo EO, Lobato F, Abreu V, Maia J, Nascimento R. (1998). Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 50:239-242.
3. Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT, Erskine RJ. (2013) Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 96(3):1591-7.
4. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, Zalucha J, Erskine RJ. (2014) Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 244(8):914-22.
5. Bauersachs S, Wolf E. (2013). Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. *J Reprod Immunol.* 97(1):20-6.
6. Brunetto GS, Massoud R, Leibovitch EC, Caruso B, Johnson K, Ohayon J, Fenton K, Cortese I, Jacobson S. (2014). Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *J Neurovirol.* 20(4):341-51.
7. Bucafusco D, Di Giacomo S, Pega J, Juncos MS, Schammas JM, Perez-Filgueira M, Capozzo, A. (2014). Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine.* 32(48):6576–6582.
8. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med.* 32:149-170.
9. Capozzo AV, Periolo OH, Robiolo B, Seki C, La Torre JL, Grigera PR. (1997). Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine.* 15(6-7):624-30.
10. De la Sota, MD. (2004). Manual de procedimientos Leucosis Bovina Enzoótica, Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. Disponible en:[http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales\\_de\\_procedimiento/09%20Leucosis.pdf](http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/09%20Leucosis.pdf) Fecha de consulta: 28/07/16.
11. Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM, Sordillo LM. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int.* 3:915747.

12. Estes M, Brown W. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 90(1):1-10.
13. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*. 43(10):621-30.
14. Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 191:29-37.
15. Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 151:255–263.
16. Gutiérrez G, Carignano H, Alvarez I, Martínez C, Porta N, Politzki R, Gammella M, Lomonaco M, Fondevila N, Poli M, Trono K. (2012). Bovine Leukemia Virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Veterinary Research* 8:187.
17. Gutiérrez G, Rodríguez SM, de Brogniez A, Gillet N, Golime R, Burny A, Jaworski JP, Alvarez I, Vagnoni L, Trono K, Willems L. (2014). Vaccination against  $\delta$ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*. 6(6):2416-27.
18. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*. 51(2):540-6.
19. Hopkins SG, Digiacomio RF. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 13:107–128.
20. Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, Esteban EN (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci*. 99(6):4586-9.
21. Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. (2001). Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 63:703–708.
22. Kale M, Bulut O, Yapkiç O. (2007). Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *Journal of the South African Veterinary Association*. 78:130–2.
23. Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus, in: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*, Plenum Press. 39-81.
24. Knight PA, Queminet J, Blanchard JH, Tilleray JH. (1990). In vitro tests for the measurement of clostridial toxins, toxoids and antisera. II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*. 18(4):263-270.
25. Krt B. (1999). Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Clostridium perfringens* beta anti-toxins. *FEMS Immunol Med*

- Microbiol. 24(3):293-7.
26. Lavoria MA, Di-Giacomo S, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Perez-Filgueira DM, Capozzo AV. (2012). Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against foot-and-mouth disease virus in cattle. *Vaccine*. 30(48):6845–6850.
  27. Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. (2004). 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*. 115(2):167-75.
  28. Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res*. 11:353-358.
  29. Maradei E, La Torre J, Robiolo B, Esteves J, Seki C, Pedemonte A, Iglesias M, D'Aloia R, Mattion N. (2008). Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*. 26(51):6577–6586.
  30. Marshak RR. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J. Natl. Cancer Inst*. 41:243-263.
  31. Martín D, Arjona A, Viana M, Soto I, Barquero N, Gómez-Lucía E. (2000). Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzoótica. *Med. Vet*. 17:133-141.
  32. Ministerio de Ganadería agricultura y Pesca (MGAP). Legislación Sanitaria Animal. Available at: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-legislacion-sanitaria,O,es,0>. Accessed 15 Ago 2016.
  33. Montgomery G, Sise J. (1990). Extraction of DNA from Sheep White Blood-Cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 33(3):437-441
  34. Moratorio G, Obal G, Dubra A, Correa A, Bianchi S, Buschiazzo A, Cristina J, Pritsch O. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol*. 155(4):481-9.
  35. Mulcahy G, Gale C, Robertson P, Iyisan S, DiMarchi RD, Doel TR. (1990). Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 8(3):249-56.
  36. Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, Murata S, Ohashi K. (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Veterinary Record*. 173:527.
  37. Pega J, Bucafusco D, Di Giacomo S, Schammas JM, Malacari D, Capozzo AV, Arzt J, Pérez-Beascochea C, Maradei E, Rodríguez LL, Borca MV, Pérez-Filgueira M. (2013). Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-



- infected cattle. *J Virol.* 87(5):2489-95.
38. Pega J, Di Giacomo S, Bucafusco D, Schammas J, Malacari D, Barrionuevo F, Capozzo A, Rodríguez L, Borca M, Pérez-Filgueira M. (2015). Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection. *J Virol.* 89(18):9581-90.
  39. Pelzer KD. (1997). Economics of Bovine Leukemia Virus Infection. *Vet. Clin. Am.-Food Anim. Pract.* 13(1):129-141.
  40. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem.* 84(2):1003-11.
  41. Pyeon D, Diaz F, Splitter G. (2000). Prostaglandin E2 Increases Bovine Leukemia Virus tax and pol mRNA Levels via Cyclooxygenase 2: Regulation by Interleukin-2, Interleukin-10, and Bovine Leukemia Virus. *Journal of Virology.* 74:5740-5745.
  42. Puentes R, De Brun L, Algorta A, Alvarez JP, Sacco G, Oliveira M, Llambí S. (2016a). Horizontal transmission dynamics of Bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected holstein heifers. *Science and animal health. In press.*
  43. Puentes R, De Brun L, Algorta A, Da Silva V, Mansilla F, Sacco G, Llambí S, Capozzo AV. (2016b). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res.* 12(1):119.
  44. Puentes R, Panei CJ, Flatschart A, Gomes, B, De Brun L, Leites M, Galosi C, Nicolini P, LLambí S, Flatschart R. (2016c). Molecular diagnosis of bovine leukemia virus based on the Droplet Digital PCR Enviado a Veterinaria (Montevideo).
  45. Reed MJ, Muench H. (1938). A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
  46. Robiolo B, La Torre J, Duffy S, Leon E, Seki C, Torres A, Mattion N. (2010). Quantitative single serum-dilution liquid phase competitive blocking ELISA for the assessment of herd immunity and expected protection against foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. *Journal of Virological Methods.* 166:21–27.
  47. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses.* 3(7):1210-1248.
  48. Rola-Łuszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuźmak J. (2013). Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods.* 189(2):258-64.
  49. Salvarini F, Lobato Z, Assis R, Lima C, Silva R, Pires P, Lobato F. (2010). In vitro

- evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(4):778-783.
50. Salvarini F, Lobato Z, Pires P, Silva R, Alves G, Pereira P, Lobato F. (2013). In vitro potency test for evaluation of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Arq. Inst. Biol.* 80(4):450-452.
  51. Souza F, Blagitz M, Latorre A, Sanchez E, Batista C, Weigel R, Renno F, Sucupira M, Della Libera A. (2012) Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *J Vet Med Sci.* 74(2):221-5.
  52. Souza M, Lobato Z, Pires P, Silva R, Salvarani F, Assis R, Lobato F. (2010). Standardization of the titration of the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D in cell line as an alternative to animal bioassay. *Ciência Rural* 40(3):600-603.
  53. Trypsteen W, Kiselinova M, Vandekerckhove L, De Spiegelare W. (2016). Diagnostic utility of droplet digital PCR for HIV reservoir quantification. *J Virus Erad.* 2(3):162-9.
  54. Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine.* 94:54–64.
  55. World Organization for Animal Health (OIE). *Enzootic Bovine Leukosis*. In: *Terrestrial animal health code* [online]. Paris: OIE; 2012. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_EBL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf). Acesso 02 Ago 2016.
  56. World Organization for Animal Health (OIE). *Leptospirosis* [online]. Paris: OIE; 2008. Available at: [http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.01.09\\_LEPTO.pdf](http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.01.09_LEPTO.pdf) Accessed 15 Ago 2016.

## **Anexos**

## HORIZONTAL TRANSMISSION DYNAMICS OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS (BLV) AND NEGATIVE EFFECT ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN NATURALLY INFECTED HOLSTEIN HEIFERS

PUENTES, Rodrigo <sup>1</sup>;  
DE BRUN, Laureana <sup>1</sup>;  
ALGORTA, Agustina <sup>1</sup>;  
ALVAREZ, Juan Pedro <sup>1</sup>;  
SACCO, Gustavo <sup>2</sup>;  
OLIVEIRA, Martha <sup>3</sup>;  
LLAMBÍ, Silvia <sup>4</sup>.

Received: 19/05/2016

Accepted: 12/07/2016

<sup>1</sup>Immunology Area, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Uruguay; <sup>2</sup>Independent Veterinary Practice, Florida, Uruguay; <sup>3</sup>Albert Sakzewski Virus Research Centre, Clinical Medical Virology Centre, School of Chemistry and Molecular Bioscience, The University of Queensland, Australia; <sup>4</sup>Genetics Area, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Uruguay.

### ABSTRACT

**B**LV causes one of the most relevant viral diseases of dairy cattle although the most of the infected animals are asymptomatic. There are controversies regarding reproductive losses on infected herds. Our purpose was to evaluate the horizontal transmission of the virus in a group of Holstein heifers confined in a rearing system and to determine the impact of infection on reproductive performance. Three hundred eighty-nine animals were sampled and seroconversion was determined by ELISA. The occurrence of estrous behavior, number of services/pregnancy, conception rate, percentage of pregnant animals by artificial insemination and by bull service during two breeding periods (June-July and November-December 2012) were recorded. Herd BLV initial seroprevalence was 45% and annual conception rate was 39.8% (CI 30.5%-49%). During the 18 month time course two seroconversion peaks were detected. The first one happened during the admission period, most likely due to quarantine and intensive health management of the animals. The second peak occurred during the first gestational period. At the end of the study, 73.6% of the heifers were BLV seropositive and there was reduction of 27% in the herd conception rate in the second breeding period ( $p=0.005$ ). In conclusion, BLV infection and reproductive performance were negatively associated and high seroconversion was observed during the gestational period.

**Keywords:** Rearing system. Reproductive failure. Infectious disease.

## INTRODUCTION

Enzootic bovine leukosis is an infectious disease caused by Bovine Leukemia Virus (BLV). It is worldwide distributed having a great importance, especially in dairy systems (LUCHTER, 2004). Nowadays, 21 countries and Western Australia have successfully eradicated BLV from their herds (BARTLETT et al., 2014). In South America, this disease is widely spread in bovines. In Uruguay, the prevalence can reach 77% in dairy cattle (FURTADO et al., 2013). In order to develop effective BLV control strategies, quantitative information about virus transmission on the field is needed, as well as details about duration of infectious period, probability of transmission by exposure, and veterinary practices that are associated with higher transmission, among other indicators. Although there are some data in the literature related to these aspects, information is somewhat contradictory and insufficient to design an efficient control system (BARTLETT et al., 2014; MONTI et al., 2007).

BLV can be transmitted both vertically and horizontally by infected lymphocytes. Horizontal transmission occurs mainly iatrogenically, when animals are manipulated without proper hygienic care during veterinary procedures such as dehorning, tattooing, vaccination, castration and rectal tact. Transmission by hematophage insects has also been reported, especially by insects from *Tabanidae* family. Although individually these sources of infection could not be significant, when analyzed together they become relevant to transmission of BLV (BARTLETT et al., 2014).

After the infection, approximately 40% of the animals develop persistent lymphocytosis in the following years and 5% malignant lymphoma, causing direct herd losses. Some investigations show that subclinical infection with BLV directly impact milk production and longevity of the cow (BARTLETT et al., 2014). VanLeeuwen et al. (2010) reported that BLV seropositive cows had a conception rate 7% lower when compared with seronegative cows. However, other authors did not observe any association between BLV seropositive animals and dairy yield, milk composition, or reproductive performance (KALE et al., 2007; TIWARI et al., 2007). The purpose of this study was to describe seroconversion of BLV associated with management practices and to determine the impact of infection on reproductive performance of Holstein heifers.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Herd and health management**

The experiment was carried out in a rearing farm located in Southern Uruguay that rears Holstein calves from different dairy farmers of the area. Six to ten months old animals were admitted and remain in the field for about 18 months until returning to their original farm with approximately 7 months of pregnancy. The establishment had no sanitary requirements regarding the entry of animals with positive serology for BLV.

At admission, calves were identified with a tag containing the farmer data and the number assigned to the animal. Then, they were weighted, dewormed and subjected to a prescribed health plan based primarily on antiparasitic drugs and vaccination against *Bacillus anthracis*, *Clostridium* spp., keratoconjunctivitis (*Moraxella bovis*) and brucellosis. Reproductive management consisted of estrous synchronization with two doses of a prostaglandin analogue, artificial insemination (AI) (up to three per animal) and service with bulls after each period of AI, followed by estrus recording twice a day and pregnancy diagnosis. This process took place twice, from June to July and from November to December of 2012. In order to avoid iatrogenic transmission of viruses, multidose syringes, needles, dehorning equipment, surgical equipment, gloves or any material that made direct contact with blood were soaked in disinfectant between each animal (Despadac–Calier S. A.-Spain).

### **Sampling**

Three hundred eighty-nine animals from 29 farms were considered for the study. After arriving at the rearing farm, blood samples were taken and processed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Only BLV seronegative animals were included in the study. After each round of health or reproductive management, blood samples were collected and BLV infection was determined by ELISA. These animals were monitored by 18 months, being serology of every animal tested five times: on September of 2011 (first sampling), on December of 2011 (second sampling), on March of 2012 (third sampling), on July of 2012 (fourth sampling), and on December of 2012 (fifth sampling).

### **Anti-gp51 antibody detection by ELISA**

A commercial kit for detection of antibody to BLV gp51 in bovine sera with 98% sensitivity and 100% specificity (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA, approved by United States Department of Agriculture-USDA) was used to determine animal serum status. Samples were processed according to manufacturer's instructions and the reading was performed at 620 nm in a visible range spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Three weak positive controls were used per plate and the cut-off for each plate was calculated from the optical density (OD) mean of the positive controls. According to their OD, positive samples were classified into weak, moderate and strong positive (GUTIÉRREZ et al., 2012).

### **Data collection and statistical analysis**

For each animal, age by dentition, serological status, and measures of health and reproductive parameters were collected during the 18 months. The prevalence was estimated with a confidence interval of 95% (CI 95%). To analyze the different variables, Chi2 test were performed and an alpha <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using STATA v 11.2 software (StataCorp, 2009) and a Kaplan-Maier curve for overall survival time and event from this study was made using Graphpad 6.01. The variables analyze were:

Estrous behavior – Detected by visual observation of estrus signs during one hour at the morning and one hour at the evening (stands while being mounted, mucus discharge and restlessness).

Number of services/conception - total number of services offered to a group of animals in a defined period divided the number of animals that resulted pregnant.

Conception rate - percentage of pregnant animals divided the total of animals served in a defined period of time.

Pregnancy rate - number of pregnant animals by bull or AI divided the total number of animals served.

## RESULTS AND DISCUSSION

The serological BLV prevalence of heifers entering the establishment was 45% (CI 95%: 40.33%-49.65%). Correcting to true prevalence, 45.9% of heifers were seropositive (CI 95%: 41.23%-50.57%). Annual seroconversion rate was 39.8% (CI 95%: 30.5%-49%) and the seroconversion rate at the end of the study (18 month) was 52.7% (CI 95%: 43.5%-61.9%). Serologic prevalence of animals departing the farm was 73.6% (Table 1). No association was found between the age (milk teeth, two teeth,  $\geq$  four teeth) and the presence of BLV antibody.

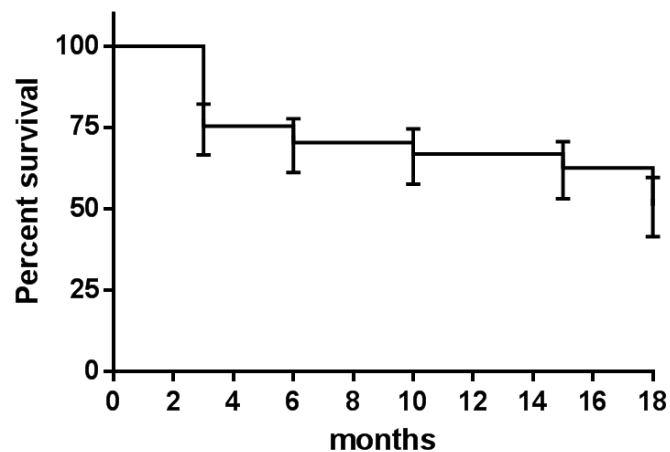
**Table 1** - Dynamics of seroconversion against BLV during the study

	2011		MAR	2012		2013
	SET	DEC		JUL	DEC	MAR
Seronegative	214	87	79	73	68	52
Seropositive	175	29	6	5	5	13
Total	389	116	85	78	73	65
Apparent prevalence (%)	45	70,5	72,9	75	77,1	81,9
Dropout among seropositives during testing interval	-	-	-	-	-	-
Dropout among seronegatives during testing interval	-	98	3	1	0	3
Seroconversion rate (%)	-	25	7,1	6,4	6,8	20,0

The seroconversion incidence was analyzed and compared with health and reproductive management in five periods. The first and last sampling period presented higher seroconversion incidence (respectively 25% and 20%), while the second, third and fourth samplings showed low and similar seroconversions (7%, 6.4% and 6.8%, respectively). Before the first sampling (seroconversion incidence 25%), the animals undertook several clinical procedures in quarantine. Heifers were tagged, dehorned, dewormed and tested for tuberculosis. Animals were also vaccinated against the main endemic diseases and injected with vitamin supplements. In the second sampling (seroconversion incidence of 7%), animals



were submitted to a vaccine booster against *Clostridium* spp. and to blood collection for brucellosis. In the third (seroconversion incidence of 6.4%) and fourth (seroconversion incidence of 6.8%) samplings, procedures consisted of estrous synchronization, artificial insemination, pregnancy diagnosis by rectal examination and ultrasound, and vaccination against leptospirosis. In the fifth and final sampling (seroconversion incidence of 20%), no procedures were applied, as animals were close to departure; at this point animals were 7 to 8 months pregnant. To visualize the dynamics of seroconversion during the assay, survival analysis is shown in the Figure 1. The seroconversion probability at the end of the study was 50.94%.



**Figure 1** - Seroconversion analysis of heifers throughout the study period. Confidence intervals 95% are shown.

Different parameters of reproductive efficiency were evaluated in two periods (June-July and November-December). Analyzing the data from both periods (n= 251 heifers), the presence of antibodies against BLV did not influence the heat behavior or the number of services required per animal. Additionally, there was no relationship between seropositivity degree (weak, moderate or strong) and the number of services required or occurrence of pregnancy. Analysis of the 251 heifers inseminated in both breeding periods also did not show association between pregnancy and BLV serum status.

When it was compared total conception rate of each period, we did not find differences between June-July (80.5%, 145/180) and November-December (76.1%, 54/71) rates. When animals were grouped by serological status, conception rate of seronegative animals

(77.50%) was not statistically different from seropositive animals (81.43%) in the first period of artificial insemination (June-July); however, in the second reproductive period (November-December), conception rate was significantly different between seronegative (93.33%) and seropositive (66.67%) animals ( $p=0.006$ ) (Table 2).

**Table 2** - BLV serology in each reproductive period by pregnancy diagnostic.

BLV serology	June-July period		November-December period	
	Empty heifers**	Pregnant heifers	Empty heifers**	Pregnant heifers
Negative	9/40 (22.50%)	31/40 (77.50%)	2/30 (6.67%)	28/30 (93.33%)*
Positive	26/140 (18.57%)	114/140 (81.43%)	26/78 (33.33%)	52/78 (66.67%)*

\*  $p=0.006$ ; \*\* Empty = non pregnant.

Later, when the animals were categorized as weak, moderate and strong seropositive, no association was found between conception rate and the level of antibodies in the animals (Table 3).

**Table 3** - Grade of BLV seropositivity in each reproductive period by pregnancy diagnostic.

BLV serology	June-July period		November-December period	
	Empty heifer**	Pregnant heifer	Empty heifer**	pregnant heifer
Weak positive	1/16 (6.25%)	15/16 (93.75%)	2/6 (33.33%)	4/6 (66.67%)
Moderate positive	5/27 (18.52%)	22/27 (81.48%)	8/18 (44.44%)	10/18 (55.56%)
Strong positive	20/97 (20.62%)	77/97 (79.38%)	16/54 (29.63%)	38/54 (70.37%)

$p>0.05$ ; \*\* Empty = non pregnant.

Analysis of the bulls used for natural mating revealed that 57% were seropositive for BLV. However, no significant differences were found between the overall percentage of pregnant animals by bulls or AI. Moreover, the number of services needed in both periods together

did not vary significantly between seropositive and seronegative animals. In the June-July breeding period, seronegative and seropositive heifers required 1.65 and 1.64 services respectively, to achieve a pregnancy, while in the November-December the amount of services needed to achieve a pregnancy was 1.46 and 2.35 for seronegative and seropositive animals respectively. Even though an increase was detected in seropositive animals, the difference was not significant.

We found a high percentage of BLV seropositive animals (45%) at the beginning of the experiment, which was unexpected, considering the age of these animals (6 to 10 months old). In Argentina, Gutiérrez et al. (2011) found a seroprevalence of 11% and 17% in animals of 9 and 18 months of age, respectively, in similar production systems to those of Uruguay. Since vertical transmission of the virus is estimated up to 15% (HOPKINS et al., 1997), and iatrogenic transmission has been suggested as the main route of transmission (by veterinary instruments with infected blood), such high prevalence found in young animals should be deeply investigated. Heifers at this age have not yet been subject to many veterinary management practices that favor viral transmission, suggesting that other ways of horizontal transmission might be playing a bigger role here. Furthermore, Gutiérrez et al. (2011) failed to reduce transmission by applying sanitary management measures aimed at preventing the spread among animals, suggesting that other pathways of viral transmission might be participating in natural conditions. Another explanation for this high percentage of infected young animals could be that vertical transmission has been underestimated.

Iatrogenic practices are considered one of the main routes of transmission of BLV (HOPKINS et al., 1997). This study was performed in the biggest rearing farm in Uruguay, where veterinarians and farmers share a genuine interest in following safe practices, but, still, the annual seroconversion found in the examined group of heifers was 39.8%. The sanitary measures employed at the rearing farm consist of disinfecting the surgical instruments by dipping them in commercial antiseptic solution (Despadac–Calier S. A.-Spain) after each use. In this way, they try to inactivate the virus and prevent spread from animal to animal. While some commercial disinfectants are recommended to inactivate viral particles, it is questionable their effectiveness at inactivating virions present inside cells, as it is the case of

BLV, whose provirus is integrated into the cellular genome. Furthermore, the accumulation of organic matter in the disinfectant most likely decreases the efficiency of the product. Gutiérrez et al. (2011), in similar conditions, found a transmission rate of 24% during 27 months, not observing significant changes in prevalence after 3 years in a closed herd in Argentina. They suggest that the BLV cycle of transmission cannot be efficiently broken with an intervention based only on preventing the iatrogenic blood contact, and that other way (s) of transmission play a key role under natural conditions. Their findings corroborate our results, suggesting that the measures taken to avoid iatrogenic transmission are not being totally effective, at least in these conditions. On the other hand, a study in Virginia (United States) achieved indeed a 27% reduction in prevalence in two years by introducing some sanitary measures: changing needles and gloves for every animal, disinfecting tattoo equipment, using an electric dehorner, milk replacer, and heating the colostrum prior to administration in dairy herds (SPRECHER et al., 1991). Despite this great reduction, it is important to highlight that this result may be an overestimate, since seroprevalence was diagnosed by agar gel immunodiffusion, which it is less sensitive technique of all available and recommended by the OIE (OIE, 2012; TRONO et al., 2001). Replacing needles instead of disinfecting them could be a more effective option to prevent transmission, however, it is not practical to implement in production systems such as those of Argentina and Uruguay, where there are herds with large numbers of animals. In fact, more research should be made demonstrating the efficacy of disinfection of needles and instruments by immersion and, if necessary, to develop a practical but effective guideline to inactivate BLV.

Iatrogenic transmission is not the only route of BLV infection. Arthropods are known to be very effective transmission vectors (RODRIGUEZ et al., 2011). Several studies have shown that horn flies (*Haematobia irritans*) and horse flies (*Tabanidae* family) are capable of carrying the virus from one animal and transmit it to others. Ooshiro et al. (2013) recently demonstrated that vector control in properties is an effective strategy to control the infection with BLV. In our study, animals were treated regularly with drugs to control both flies, so we believe that this transmission did not play an important role in the results. Still, as this was a field study, BLV transmission by vectors cannot be completely ruled out as a potential source of transmission.

Finally, some authors have suggested that direct contact between animals can play a critical role in viral transmission. Sargeant et al. (1997) demonstrated a significant decrease in prevalence after three years of complete physical separation between negative and positive animals. Gutiérrez et al. (2011) suggested an alternative design strategy based on the selective separation of animals according to their proviral load in peripheral blood. If direct contact between animals is a crucial way of transmission, surpassing iatrogenic, then the strategy used by some countries, where BLV control is based on identification and differential management of seropositive and seronegative animals (segregation of animals), is probably a more effective control measure.

Seroconversion against BLV throughout the study period could be linked to specific veterinary practices or physiological stages of the animals. During the 18 months, two peaks were detected in seroconversion. The first occurred at the beginning of the experiment with a seroconversion incidence of 25% of seropositive animals and coincided with the period of greatest health management of the heifers, which could have transferred infected blood between animals. Horizontal transmission of the virus by vaccinations, dehorning, rectal examination and surgeries has been described as one of the main routes of transmission of bovine leukosis (HOPKINS et al., 1997; MAMMERICKX et al., 1987). It should be noted that, in the case of BLV, there is a window period of 2 to 8 weeks after infection, during which antibodies are not detected (TOMA et al., 1990). Therefore, some animals could have entered the rearing system already infected, but presented a false negative result in the first ELISA screening, but were positive in the first sampling, increasing the number of seroconversions during this period. The other peak of seroconversion (20%) was observed in the fifth sampling, when the majority of the herd was pregnant at this point. During the gestational period, a state of natural immune modulation is established. A gradual decrease in some immunologic functions marks this period, reaching its minimum expression immediately before parturition (LACETERA et al., 2005; WAGTER et al., 1996). It has been found for example that prostaglandin E<sub>2</sub>, a hormone produced during pregnancy in cattle, suppresses T cell proliferation and inhibits the production of IL-12 by macrophages and of Th1 cytokines (e.g. IL-2 and IFN gamma) (KABEYA et al., 2001). It has also been shown that treatment with corticosteroids and prolactin in combination with insulin stimulates the

expression of BLV in cell lines (NIERMANN and BUEHRING, 1997). Although these are *in vitro* experiments, this could be an indicator of how is the infection in the context of pregnancy. At this point, reproductive management of heifers (concentration of animals for heat detection twice a day, artificial insemination, pregnancy diagnosis and service with bulls) had been made. Thus, these procedures could too be related to the increased transmission of the virus during this period. Bull servicing also cannot be dismissed as possible viral transmission route, since 57% of the bulls used were positive to BLV. Because BLV can potentially be excreted in the semen (DUS SANTOS et al., 2007), Erskine et al. (2012) proposed that the use of artificial insemination in heifers could reduce the prevalence of BLV, compared with using natural service. During the others sampling periods, only small rates of seroconversion were observed, coinciding with periods of lesser veterinary handling of the heifers.

Significant differences in conception rate between seropositive and seronegative animals were found in the second breeding period (November-December), during which conception rate was 27% lower in seropositive animals. VanLeeuwen et al. (2010) found that conception rate of seropositive animals was 7% lower than in seronegative animals, but that difference was not significant. Kale et al. (2007) found no statistical differences not only in reproductive performance but also in the number of inseminations necessary for pregnancy in seronegative and seropositive animals. Our results, showed a higher number of services required to achieve pregnancy during the period of November-December (1.46 and 2.35 in seronegative and seropositive animals respectively), and also it was also not significant. Nonetheless, even if the positive heifers didn't need more services to become pregnant, they did not presented full term pregnancies, exhibiting a higher rate of abortions ( $p=0.006$ ). Gutiérrez et al. (2012) suggested that the level of p24 antibody titers reflects the viral load in infected animals. Even though we used an ELISA that detects antibodies against gp51, we tried to establish a relationship between production losses and antibody levels, comparing antibody titers (weak, moderate or strong) and reproductive rates of seropositive animals. However, differences in reproductive rates by level of seropositivity were not significant.

It is still unclear why a significant difference in conception rate between seropositive and seronegative animals was found in the breeding period of November-December, but not in the June-July period. Nutritional and management factor could explain the differences in the conception rates. To verify this, diet and clinical practices employed during each period were compared and cross-referenced against conception rates, but there were no differences in treatments applied. Another explanation could be that seasonal factors influenced viral load in seropositive animals, which, in turn, influenced the conception rate. In this study, the differences in conception rate between BLV seropositive and seronegative animals were precisely during the spring and summer (November - December). During the warmer seasons, the presence of hematophagous insects is notoriously higher. Reinfection of positives animals could occur, increasing viral loads (booster effect). This hypothesis has not been demonstrated and it should be tested in future field experiments.

## **CONCLUSION**

In conclusion, our results suggest that BLV may impact cattle reproductive performance, specifically decreasing conception rate of Holstein heifers. Moreover, we found a high prevalence of young seropositive animals entering the rearing system, most of which had not been previously exposed to veterinary management practices. Thus, even though iatrogenic transmission may play a part in BLV transmission, it is clearly not the only component involved. Since we detected a great number of heifers that seroconverted during the gestational period, a feasible BLV control measure would be separate seropositive and seronegative animals at least during the gestational period, preventing seroconversions and vertical transmission at once.

## **DINÂMICA DA TRANSMISSÃO HORIZONTAL DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (BLV) E EFEITO NEGATIVO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA NATURALMENTE INFECTADAS**

### **RESUMO**

**O** BLV causa uma das doenças virais mais relevantes do gado de leite, embora a maioria dos animais infectados seja assintomática. Há controvérsias a respeito da ocorrência de perdas reprodutivas em rebanhos infectados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a transmissão horizontal do vírus em novilhas Holandesa confinadas num sistema de recria e determinar o impacto da infecção sobre o desempenho reprodutivo. Trezentos e oitenta e nove animais foram amostrados e a soroconversão foi determinada por ELISA. A ocorrência do comportamento estral, número de serviços/gestação, taxa de concepção, percentagem de animais prenhes por inseminação artificial e por serviço de touro durante dois períodos reprodutivos (Junho-Julho e Novembro-Dezembro/2012) foram registrados. A soroprevalência inicial era 45% e a taxa de concepção anual 39,8% (IC 30,5%-49%). Durante os 18 meses de ensaio, dois picos de soroconversão foram detectados. O primeiro aconteceu durante o período de entrada dos animais ao campo, provavelmente devido à quarentena e manejo sanitário intensivo dos animais. O segundo pico ocorreu durante o primeiro período gestacional. No final do estudo, 73,6% das novilhas foram soropositivas e houve uma redução de 27% na taxa de concepção no segundo período reprodutivo ( $p=0,005$ ). Em conclusão, a infecção pelo BLV e o desempenho reprodutivo foram negativamente associados e foi observada uma alta soroconversão durante o período gestacional.

**Palavras-chave:** Sistema de recria. Falha reprodutiva. Doença infecciosa.

## **DINAMICA DE LA TRANSMISIÓN HORIZONTAL DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (BLV) Y EFECTO NEGATIVO SOBRE EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO EN VAQUILLONAS HOLANDO NATURALMENTE INFECTADAS**

### **RESUMEN**

**B**LV causa una de las enfermedades virales más importantes en el ganado lechero pero la mayoría de los animales infectados son asintomáticos. Existe controversia sobre pérdidas reproductivas causadas por esta enfermedad en los rebaños infectados. El objetivo de este ensayo fue evaluar la transmisión horizontal del virus en vaquillonas Holstein confinadas en un sistema de cría y determinar el impacto de la infección sobre el rendimiento reproductivo. Trescientos ochenta y nueve animales fueron muestreados y la seroconversión se determinó mediante ELISA. La manifestación de celo, número de



servicio/gestación, tasa de concepción, porcentaje de hembras preñadas por inseminación artificial y servicio de toro durante dos temporadas de cría (junio-julio y noviembre-diciembre/2012), fueron registrados. La seroprevalencia inicial contra BLV fue del 45% y la tasa de concepción anual fue del 39,8% (IC del 30,5%-49%). Durante los 18 meses del ensayo, se detectaron dos picos de seroconversión. El primero ocurrió durante el período de ingreso de los animales al campo, muy probablemente debido a la cuarentena y manejo intensivo de los animales. Y el segundo pico se produjo durante la gestación. Al final del ensayo, 73,6% de las vaquillonas eran seropositivos y hubo una reducción del 27% en la tasa de concepción en el segundo periodo reproductivo en los animales seropositivos a BLV ( $p=0,005$ ). En conclusión, la infección con BLV y el rendimiento reproductivo se asociaron negativamente y se observó una alta seroconversión durante el período gestacional.

**Palabras clave:** Sistema de recria. Fallas reproductivas. Enfermedad infecciosa.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the personal of the “Campo de Recría La Cruz” (Florida, Uruguay) for the field activities support. Financial support was provided by the CSIC (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay) and CIDEA (Facultad de Veterinaria, Uruguay). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### REFERÊNCIAS

- BARTLETT, P. C.; SORDILLO, L. M.; BYREM, T. M.; et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, p. 914–922, 2014.
- DUS SANTOS, M. J.; TRONO, K.; LAGER, I.; et al. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 10–18, 2007.
- ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; BYREM, T. M.; et al. Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 445–450, 2012.
- FURTADO, A.; ROSADILLA, D.; FRANCO, G.; et al. Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 191, p. 29-37, 2013.

- GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; POLITZKI, R.; et al. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 151, p. 255–263, 2011.
- GUTIÉRREZ, G.; CARIGNANO, H.; ALVAREZ, I.; et al. Bovine Leukemia Virus p24 antibodies reflect blood proviral load. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 187, 2012.
- HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, p. 107–128, 1997.
- KABEYA, H.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 703–708, 2001.
- KALE, M.; BULUT, O.; YAPKIC, O. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, p. 130–132, 2007.
- KOHARA, J.; KONNAI, S.; ONUMA, M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 25–30, 2006.
- LACETERA, N.; SCALIA, D.; BERNABUCCI, U.; et al. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2010–2016, 2005.
- LUCHTER, F. **Enfermedades crónicas. In: Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. Enfermedades infecciosas de los Rumiantes.** Buenos Aires: Editorial Universitaria de la Patagonia. p. 123-143, 2004.
- MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; DE CLERCQ, K.; et al. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. **Leukemia Research**, v. 11, p. 353–358, 1987.
- MONTI, G. E.; FRANKENA, K.; DE JONG, M. C. M. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 228–237, 2007.
- NIERMANN, G. L.; BUEHRING, G. C. Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. **Virology**, v. 239, p. 249–258, 1997.
- OIE-WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Enzootic Bovine Leukosis.** In: Terrestrial animal health code [online]. Paris: OIE; 2012. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_EBL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf). Accessed 02 Apr. 2016.

OOSHIRO, M.; KONNAI, S.; KATAGIRI, Y.; et al. Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. **Veterinary Record**, v. 173, p. 527, 2013.

RODRIGUEZ, S. M.; FLORINS, A.; GILLET, N.; et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. **Viruses**, v. 3, p. 1210–1248, 2011.

SARGEANT, J. M.; KELTON, D. F.; MARTIN, S. W.; et al. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, p. 211–221, 1997.

SPRECHER, D. J.; PELZER, K. D.; LESSARD, P. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, p. 584–588, 1991.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; et al. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 659–669, 2007.

TOMA, B.; ELIOT, M.; SAVEY, M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, n. 4, p. 1077-1119, 1990.

TRONO, K. G.; PÉREZ-FILGUEIRA, D. M.; DUFFY, S.; et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 235–248, 2001.

VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; et al. 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**, v. 94, p. 54–64, 2010.

WAGTER, L. C.; MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C. M.; et al. Characterization of immune responsiveness and disease occurrence during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 79 (Suppl. 1), p. 119, 1996.

*Corresponding author:*

*Rodrigo Puentes.*

*Alberto Lasplaces, 1550 1620. CP 11600. Montevideo, Uruguay.*

*rpuentes@adinet.com.uy*

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows

Rodrigo Puentes<sup>1\*</sup>, Laureana De Brun<sup>1†</sup>, Agustina Algorta<sup>1</sup>, Valeria Da Silva<sup>1</sup>, Florencia Mansilla<sup>3</sup>, Gustavo Sacco<sup>4</sup>, Silvia Llambi<sup>2</sup> and Alejandra V. Capozzo<sup>3,5</sup>

## Abstract

**Background:** Bovine Leukemia Virus (BLV) produces disorders on the immune system in naturally infected animals, which may counteract the development of immunity after vaccination. The aim of this study was to investigate whether healthy and BLV infected cattle elicited similar humoral responses after foot and mouth disease (FMD) immunization. In a field study, 35 Holstein heifers were selected based on their BLV serological status and immunized with a single dose of a commercial bivalent oil-based FMD vaccine. Serum samples were collected at 0, 15, 60, 165 and 300 days post vaccination (dpv).

**Results:** Total anti-A24/Cruzeiro antibodies, IgM, IgG1, IgG2 titers and avidity index of specific antibodies were determined by ELISA. Although only marginally significant differences were found between groups in terms of total antibodies, anti-FMD IgM and IgG1 titers were significantly lower in heifers infected with BLV at the 15 dpv ( $p < 0.01$ ). Animals that became infected during the study did not show differences to the BLV negative group.

**Conclusions:** Cattle infected with BLV at the time of immunization may elicit a low-magnitude serological response to a commercial Foot-and-mouth disease vaccine.

**Keywords:** Immune response, BLV, Serology, FMD, Immunization, Dairy cattle

## Background

Enzootic bovine leucosis is a contagious disease of cattle induced by an exogenous retrovirus, bovine leukemia virus (BLV). It is worldwide distributed and only 20 countries had been able to eradicate the disease. Approximately 60 % of infected animals do not display clinical signs of disease, and these animals are referred to as asymptomatic or aleukemic. Approximately 30–40 % of BLV carriers will develop a persistent lymphocytosis, while fewer than 5 % develop malignant lymphosarcoma [1].

BLV positive animals at early stages of infection develop a cellular response mediated mainly by T helper 1 lymphocytes (Th1) producing IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$ . Disease progression, together with persistent lymphocytosis produces changes on the T-cells profile towards a Th2

response [2]. In this phase, there is a dramatic increase in the B-lymphocyte populations and a decrease in the percentages of both CD4+ and CD8+ T lymphocytes [3]. The altered cytokine production was suggested to be responsible for the suppressed mitogen-induced T lymphocyte proliferation in BLV-infected animals [3, 4].

Current literature discusses if these BLV-induced immune mechanisms have a detrimental impact on the ability of cattle to resist the progression of infectious disease [5–7]. Considering that BLV is endemic in many countries and approximately 60 % of the animals are asymptomatic, it is important to know how BLV infection interacts with the immunogenicity of those vaccines usually used in bovines. An early study reported a possible impairment of immune responses against rotavirus in BLV-positive animals [8]. Recently, Erskine et al. [1] verified that dairy cows that were infected with BLV had decreased antibody responses to J5 *E. coli* bacterin as compared to non-infected cows.

\* Correspondence: rpuentes@adinet.com.uy

†Equal contributors

<sup>1</sup>Immunology Area - Department of Microbiological Sciences, Faculty of Veterinary, University of the Republic (UdelaR), Montevideo, Uruguay  
Full list of author information is available at the end of the article

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious acute vesicular viral disease that affects cloven-hoofed animals and is mainly controlled by vaccination. The circulation of FMD virus (FMDV) in susceptible livestock imposes severe restrictions on the movement and trade of animals and derived products, causing serious economic loss to the affected countries [9]. FMD is endemic in many parts of Asia, Africa, and South America, where vaccination of susceptible populations is widely used as a major control measure. Commercial formulations usually contain more than one virus strain, as immune responses induced by vaccination are strain-specific [10]. Protection is mediated by specific antibodies. IgG1 has been related with protection in vaccinated cattle [11–14] while IgM mediates protection in naïve-infected cattle [15]. Maintaining high levels of total antibodies against FMDV is paramount to prevent outbreaks, keeping the OIE free-with-vaccination status and thus, the international markets.

There is no information on how the application of FMD vaccine in BLV infected animals may interfere with the immune response against FMDV. Considering the critical role that T- and B-cell populations play in humoral immunity and the immune-modulation caused by BLV in cattle, the purpose of this study was to investigate whether BLV natural infection may counteract the serological response to FMD primo- vaccination.

## Methods

### Animals

Thirty-five animals 6 to 10 months old Heifers were selected from a herd of 73 heifers according to their BLV antibodies status measured by ELISA twice (4 weeks and 1 week) before vaccination against FMD. The animals had not received anti-FMDV vaccine until the beginning of the experiment. They received one dose of FMD vaccine throughout the study, corresponding to FMD vaccination campaign of February 2014. Animals were housed in the same farm situated in the Department of Florida-Uruguay.

### Vaccine

A commercial oil-adjuvanted (water-in-oil) vaccine against FMD was used in this study. This is an oil-adjuvanted vaccine that contains two inactivated FMDV strains: O1/Campos and A24/Cruzeiro, produced by a Paraguayan manufacturer. This vaccine was approved by the “Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca” (MGAP) according to the current national regulations of Uruguay.

### Experimental design

The selected heifers were divided into 2 groups: BLV seropositive (BLV+,  $n = 20$ ) and BLV seronegative (BLV–,  $n = 10$ ). There were 5 seronegative animals at the day of

vaccination (Day 0) seroconverted throughout the study, they were considered in a third group: Seroconverted (SC). Furthermore, all seropositive animals were tested by hemogram in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) to detect leukocytosis or lymphocytosis at the beginning of the experiment using the protocol described by Marshak et al. [16]. All the selected animals were negative against anti FMDV antibodies at 0 dpv (liquid phase blocking ELISA titers  $\leq 1.5$ ).

All animals received one dose of 3 mL of FMD vaccine applied subcutaneously in the left side of the neck, according to current regulation in Uruguay [17]. Serum samples (2 aliquots of 2 mL each per animal) obtained at 0, 15, 60, 165 and 300 dpv were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further serological assessments.

### BLV antibody detection by ELISA

A commercial kit was used for detection of BLV specific antibodies in bovine sera (IDEXX, REF P02110-10 LOT 4155 N, The Netherlands. Samples were processed according to manufacturer’s instructions and the reading was performed at 450 nm in a visible range spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Two weak positive controls were used per plate and interpretation was made according to manufacturer’s protocol.

### Liquid phase blocking ELISA (LPBE)

Total anti-FMDV A24/Cruzeiro antibody responses were assessed in serum samples by LPBE performed as stated by the OIE Manual using a rabbit antiserum to capture inactivated whole 140S viral particles, and a guinea-pig antiserum as detector antibody, both of them strain-specific as described before [18]. Antibody titers were expressed as the reciprocal Log10 of serum dilutions giving the 50 % of the absorbance recorded in the virus control wells without serum.

### Single dilution avidity ELISA

Avidity assessment of specific antibodies was performed at 15 dpv as described before [12]. The Avidity Index (AI) was calculated as the percentage of residual activity of the serum sample after a 20 min urea washing step, relative to that of untreated sample:  $\text{AI}\% = (\text{OD sample with urea}/\text{OD sample without urea}) \times 100$ .

### Isotype ELISAs

Isotype ELISAs were performed as reported before [12, 18] using HRP-conjugated antibodies anti IgG1 (1:750), IgG2 (1:750) and IgM (1:500) (AbD Serotec, Oxford, UK). Briefly, 96 well flat bottom well plates (MICROLON®, Greiner Bio-One, Monroe, NC) were coated with 50  $\mu\text{l}$  per well of a dilution that contained 15 ng/well of sucrose-gradient purified FMDV 146S particles of A24 Cruzeiro strain, and blocked with dilution

buffer. Individual serum samples were run in two-fold serial dilutions starting at 1:50. Titers were expressed as the inverse dilution reaching the cut off value (0.2) calculated as mean OD + 2SD achieved by the FMDV-negative Patagonian bovine serum samples ( $n = 25$ ). Titers were expressed as the dilution factor reaching the cut-off value [12].

**Data analysis**

The “expected protection percentage” (EPP) was used as a reference to protective vaccine-induced responses. The EPP relates antibody titers measured by LPBE at 60 dpv, with the percentages of protection achieved for the same groups of animals after in vivo challenge experiments performed at 90 dpv following the “protection against generalized foot infection” (PGP) test. LPBE titers corresponding to EPP values = 75 % (EPP-75 %) are 1.90 for A24/Cruzeiro strain [19, 20].

Time-course titers obtained by LPBE, AI and IgG-subtype ELISAs were plotted and results between the three experimental groups were compared by ANOVA 2-factor repeated measures followed by Bonferroni multiple comparisons test. Mann-Whitney test was used when data from the groups were compared. The confidence interval was 95 %. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software).

**Results**

**Total antibodies against BLV and hemogram results**

Groups BLV+ and BLV- remained seropositive and seronegative respectively, whereas the SC group seroconverted during the study between day 15 and 150 of the experiment (Fig. 1). Any animal showed leukocytosis or lymphocytosis at the beginning of the experiment, which was confirmed by hemogram in PBMC.

**Total FMDV antibodies**

LPBE kinetics curves were similar between the three groups up to day 300 of the assay. Total antibody titers increased after vaccination in all the animals and this difference was significant at 15 dpv for each group compared to titers measured at 0 dpv ( $p < 0,01$ ). After that, the titers decreased and remained at low levels up to the end of the experiment. Antibody levels fell below the EPP 75 %- protective levels for FMD after 60 dpv (Maradei, et al. [19]) (Fig. 2a). Total FMD LPBE titers 15 dpv were not significantly different between groups ( $p > 0.05$ ), although titers were higher in the BLV-compared with BLV+ group (Fig. 3a).

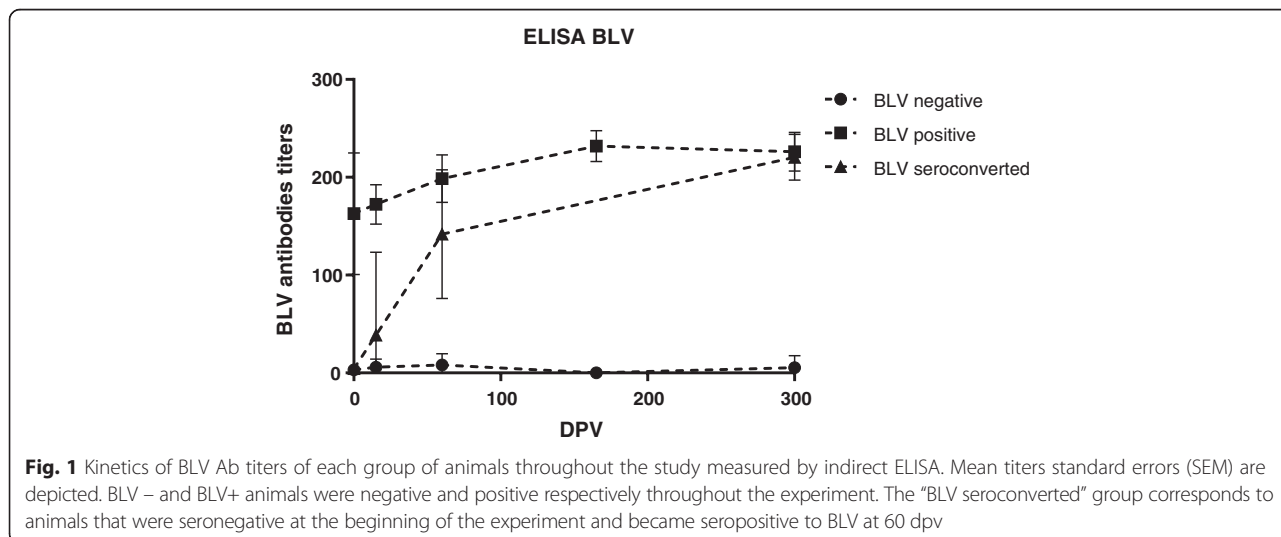
Avidity indexes kinetic curves were comparable between the groups. Antibody avidity was boosted 15 dpv, and the tendency seemed to be higher for BLV-animals, however, though differences were not significant compared to BLV+ animals (Fig. 3e).

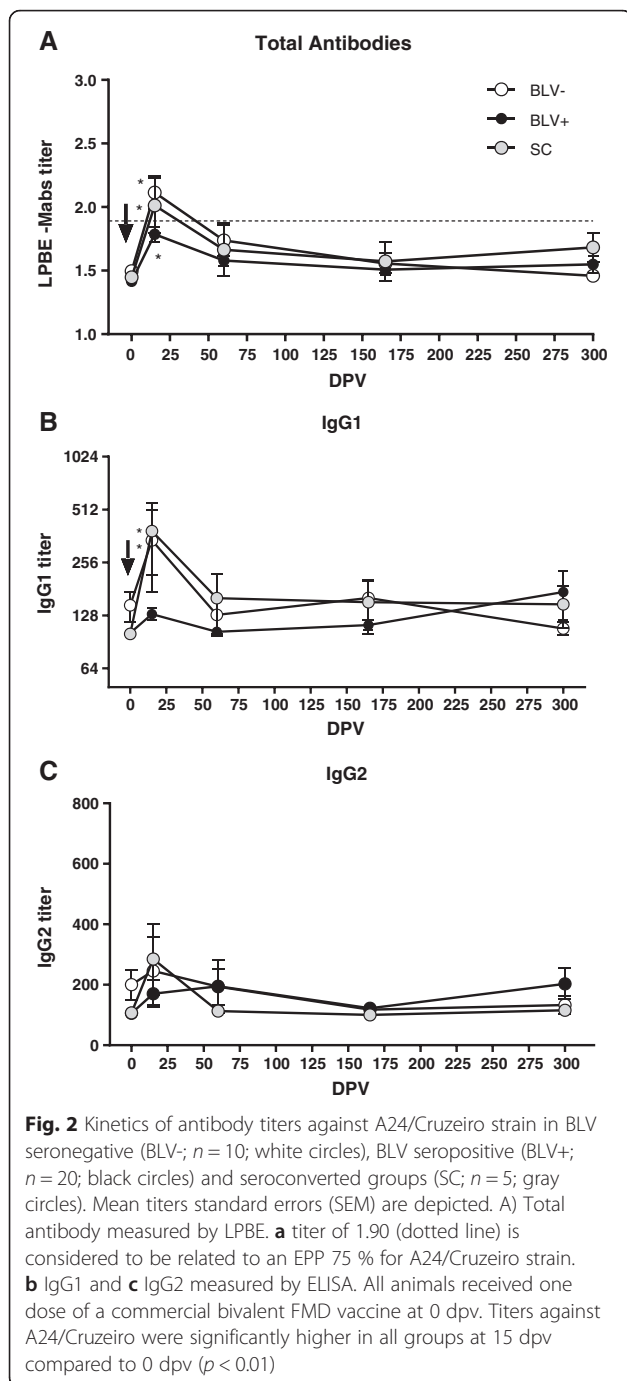
The SC group behaved as the BLV-animals, both for total antibodies and avidity.

**Isotype responses**

We then studied the isotype composition of the induced antibodies, to verify the primary (IgM) response and the switch towards IgG isotypes, indicative of T-cell collaboration. IgM, IgG1 and IgG2 titer against A24/Cruzeiro strain were measured in serum samples from the different groups along time.

An increase in IgM anti-FMDV serum titers was observed at 15 dpv in all groups, being significantly higher in BLV negative animals (Fig. 3c). IgG1 titers were also higher for BLV negative compared to BLV positive animals at 15 dpv ( $p < 0,01$ ), with a mean titer of 287,1 y 127,8 respectively (Fig. 3b). At longer time-points, however, no significant differences were





detected (Fig. 2b). IgG2 titers and kinetics were similar in all groups (Fig. 2c). Higher antibody titers were observed at 15 dpv in BLV negative animals, with a mean titer of 229.3 compared with 174.6 of BLV positive animals (Fig. 3d), although this differences were not significant ( $p > 0.05$ ). In all cases, the SC group behaved as the BLV-animals in terms of isotype responses.

## Discussion

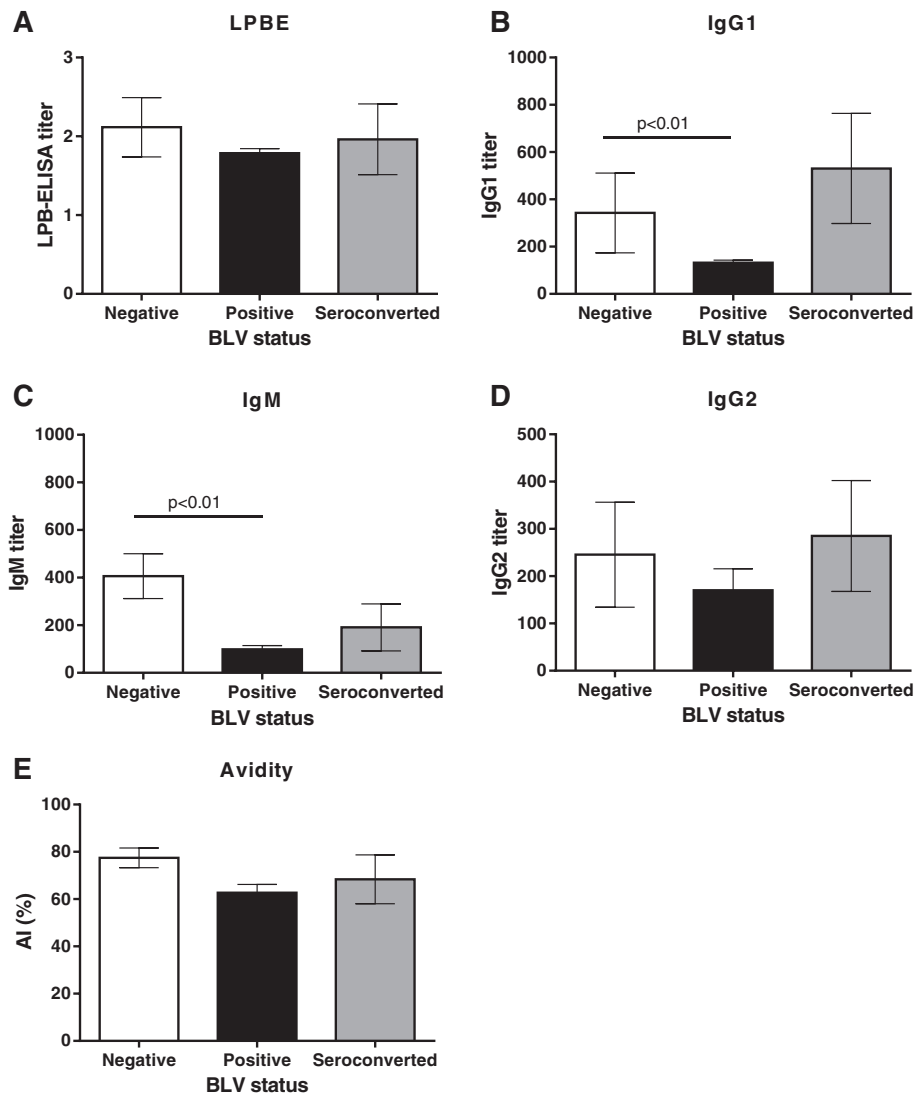
FMD has global consequences, costing an estimated USD \$6–\$21 billion each year in prevention expenditures and agricultural damage [9]. A significant portion of this cost is shouldered by the world's poorest countries, which experience major economic losses from trade restrictions [21]. Uruguay, a small country where the main economy comes from agriculture and depends heavily on the export of products of animal origin, was free from FMD without vaccination until 2000. Later, after clinical signs manifestations in cattle, government turned to compulsory vaccination in all the country. Uruguay is actually classified as free from FMD with vaccination and invests millions of dollars to assure the maintenance of the FMD-free status granted by the World Organization for Animal Health.

On the other hand, BLV is another main virosis of dairy cattle, produces chronic infections with high percentage of asymptomatic animals. BLV infection reduces expression of type 1 cytokines from CD4+ T lymphocytes, and cytokine profiles from all peripheral blood mononuclear cell populations, suggesting that both type I and II cytokines are altered with increases in IL10 and IL4, and decreases in IL2, IL12, and IFN- $\gamma$  [5, 22]. The progression of BLV is also known to disrupt the homeostasis of lymphocyte proliferation and cell death, in both B-cells and T-cells [1, 3, 4, 6].

Here we evaluated if the application of a bivalent FMD vaccine in BLV infected animals modify the humoral responses against A24/Cruzeiro strain included in the FMD vaccine. The study was designed to assess the FMD responses to match the practical approach applied in the field, where the probability of heifers to be infected with BLV at the moment of vaccination is very high, mainly in Uruguay, where the seroprevalence may reach 77 % in dairy cattle [23].

FMD immune response to vaccination is currently assessed using Liquid phase blocking ELISA (LPBE), and there are published curves relating LPBE titers with protection. An EPP of 75 % has been estimated to correspond to LPBE titers equal to 1.90 for A24/Cruzeiro strain [19, 20]. The animals included in this study presented low levels of antibody titers between 1.4 and 1.5 for A24/Cruzeiro at Day 0 of assay. This basal response could be associated to maternal antibodies transferred by colostrum because animals used were from 6 months age [24]. Even though, this response would not be interfering with oil emulsified vaccine applied in this assay [25].

After vaccination, every animal seroconverted at 15 dpv, with an average titer of 1.76 and 2.12 in BLV+ and BLV-, respectively. Although a greater response in non-infected heifers with titers higher than 1.90 (EPP of 75 %) was observed, this difference was not significant



**Fig. 3** Comparison of LPBE (a), isotypes (IgG1, (b) IgM, (c) and IgG2, (d) and avidity index (e) against A24/Cruzeiro strain for (BLV-;  $n = 10$ ; white columns), BLV seropositive (BLV+;  $n = 20$ ; black columns) and seroconverted groups (SC;  $n = 5$ ; gray columns) at day 15 post vaccination. Mean titers  $\pm$  standard errors (SEM) are depicted. All animals received one dose of a commercial bivalent FMD vaccine at 0 dpv. IgM and IgG1 against A24/Cruzeiro were significantly higher in BLV - compared to BLV + at 15 dpv ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test)

between groups ( $p > 0.05$ ). After this period, a sharp decrease in antibody titers in all groups was observed at day 60, up to levels below 75 % of EPP and then remained low until the end of the experiment (Fig. 2). Based on these results and independently from BLV status of heifers, the single dose vaccination applied in this experiment was not enough to maintain animals with acceptable levels of protective antibody titers against FMD A24/Cruzeiro strain. Although an approved commercial vaccine was used and applied according to recommendations of the Uruguayan animal health authorities, the quality of this vaccine at the exact time it was applied could not be assessed by our working group, in terms of antigen payload and integrity of 140S

particles, known to be essential for protection [26]. Thus, the data analyzed here correspond to the effect of a vaccine that elicits a short coverage of circulating antibodies within protective levels.

Analysis of the isotypes of the response induced against A24/Cruzeiro revealed that IgM, IgG1 and IgG2 titers increased in both BLV- and BLV+ heifers following FMD immunization, although IgM and IgG1 titers were higher in the BLV negative heifers. Levels of IgG2 can explain why the difference in antibody titers was only marginally significant when total antibodies were measured. On the other hand, while we found that the avidity index was lower in seropositive animals than that seronegative, these differences were not significant



(Fig. 3e). The avidity index and IgM titers were measured only 15 dpv because these decrease rapidly according to previous reports from some researchers from our group (Lavoria et al. [12]).

It is important to note that peak titers of both IgM and IgG1 may not reflect, however, the true course of the kinetics of the immune response, as many time points are missing. Higher IgM titers have been reported to take place about 7 to 10 dpv while IgG1 peak may be expected at 15–20 dpv [15, 18]. Thus, we cannot rule out if we had either a typical primary-secondary response, with a first boost of IgM followed by a delayed increase of IgG; or if a T-independent response was induced in both cases, though with lower magnitude in BLV-infected animals.

We hypothesize that, if we consider the first scenario, the immune-modulation exerted on the T lymphocytes in BLV-infected animals may account for the lower magnitude of the IgG1 anti FMDV-response. Alternations in cytokine expression have been shown to be correlated with disease progression in chronic retroviral infections, suggesting that cytokine imbalances may contribute to disease progressions [2]. Pyeon et al. [27] found that the production of Th1 cytokine was promoted in the first stage of the BLV infection (serologically positive without persistent lymphocytosis) than that in cattle with progressed disease stages with persistent lymphocytosis. It has also been shown that IgG1 expression is positively regulated by IL-4 and IgG2 expression is positively regulated by IFN-gamma [28]. So, considering that the animals used in our study were young heifers that didn't have persistent lymphocytosis at the beginning of the experiment and were probably in the early phase of infection (Th1 profile), we think that may have influenced immunoglobulin subclass switch. Further experiments are needed to support this hypothesis.

Animals that were infected with BLV between 15 to 60 dpv ("BLV seroconverted" group), did not show any difference with respect to BLV negative animals, indicating that only a pre-existing BLV infection modified the isotypes of antibodies against FMD induced by vaccination. This study is another contribution to the effect that BLV may have on immunization with commonly used vaccines. In this regard, Erskine et al. [1] also found differences on titer of BLV antibodies in infected cows when they were vaccinated against J5 *E. coli*.

## Conclusions

Our data suggests that BLV infection in dairy cattle may modify the profile of antibody response to immunization against Foot-and-mouth disease. IgM and IgG1 titers were significantly lower in heifers infected with BLV at the 15 dpv ( $p < 0.01$ ). More studies using vaccines of different potency are needed to dissect the role of BLV infection on the efficacy of Foot-and-mouth disease primo-vaccination.

## Abbreviations

AI, Avidity Index; BLV, Bovine Leukemia Virus; dpv, days post vaccination; EPP, Expected protection percentage; FMD, Foot-and-mouth disease; FMDV, Foot-and-mouth disease virus; LPBE, Liquid phase blocking ELISA; MGAP, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca; SC, Seroconverted; Th1, T helper 1 lymphocytes

## Acknowledgements

We thank the personal of the "Campo de Recría La Cruz" (Florida, Uruguay) for the field activities support. We are also thankful to Dr. Mariano Perez Filgueira for helpful discussion and also Veterinarians Sebastián Di Giacomo and María Eugenia Quintana for technical assistance.

## Funding

The scholarships, experimental and laboratory procedures for the study presented in this paper were funded by Fondo Sectorial Salud Animal (FSSA) de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación - ANII (FSSA\_X\_2014\_1\_105283), Comisión Sectorial de Investigación Científica - UdelaR (INI\_X\_2013\_1\_10100), ANII (POS\_NAC\_2015\_1\_109630) and Veterinary Research Center of Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Castelar - Argentina.

## Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: RP, LDB, AA and SL. Performed the experiments: RP, LDB, AA, VDS, GS, FM and AVC. Analyzed the data: AVC. Wrote the manuscript: RP, LDB, AA and AVC. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics and consent to participate

The experimental protocols for the cattle studies performed in this paper were approved by Comisión Honoraria de Experimentación animal (CHEA)- Universidad de la Republica Oriental del Uruguay (approval number PI 07/14-Exp. 111130-000302/14). The cattle used are owned by Dr. Gustavo Sacco who is one of the co-authors of this paper. The animals were immunized as stated by the law, during the mandatory FMD vaccination campaign in Uruguay.

## Author details

<sup>1</sup>Immunology Area - Department of Microbiological Sciences, Faculty of Veterinary, University of the Republic (UdelaR), Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup>Genetics Area, Faculty of Veterinary, University of the Republic (UdelaR), Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Centre of Veterinary Sciences and Agronomic Investigations, INTA, Virology Institute, Buenos Aires, Argentina. <sup>4</sup>Independent Veterinary Practice, Florida, Uruguay. <sup>5</sup>CONICET - National Council of Scientific and Technological Research, Buenos Aires, Argentina.

Received: 30 December 2015 Accepted: 16 June 2016

Published online: 21 June 2016

## References

- Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM, Sordillo LM. Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 Escherichia coli bacterin. *Vet Med Int.* 2011;3:915747.
- Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci.* 2001;63(7):703–8.
- Sordillo LM, Hicks CR, Pighetti MG. Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;207(3):268–73.
- Stone DM, Hof AJ, Davis WC. Up-regulation of IL-2 receptor  $\alpha$  and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;48(1–2):65–76.
- Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RTPCR. *Vet Microbiol.* 2003;94(4):283–94.

6. Tyler JW, Cullor JS, Dellinger JD. Cross-reactive affinity purification of immunoglobulin recognizing common gram-negative bacterial core antigens. *J Immunol Methods*. 1990;129(2):221–6.
7. Florin A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar AB, Defoiche J, et al. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;125(1–2):1–7.
8. Archambault D, Morin G, Elazhary MA. Possible impairment of rotavirus immune response in cattle infected with BLV. *Vet Rec*. 1989;124(21):570–2.
9. Smith MT, Bennett AM, Grubman MJ, Bundy BC. Foot-and-mouth disease: technical and political challenges to eradication. *Vaccine*. 2014;32(31):3902–8.
10. Doel TR. FMD vaccines. *Virus Res*. 2003;91(1):81–99.
11. Capozzo AV, Periolo OH, Robiolo B, Seki C, La Torre JL, Grigera PR. Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine*. 1997;15(6–7):624–30.
12. Lavoria MA, Di-Giacomo S, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Perez-Filgueira DM, Capozzo AV. Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against foot-and-mouth disease virus in cattle. *Vaccine*. 2012;30(48):6845–50.
13. Brito BP, Rodríguez LL, Hammond JM, Pinto J, Perez AM. Review of the Global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transbound Emerg Dis*. 2015. doi:10.1111/tbed.12373.
14. Pega J, Di Giacomo S, Bucafusco D, Schammas JM, Malacari D, Barrionuevo F, et al. Systemic foot-and-mouth disease vaccination in cattle promotes specific antibody-secreting cells at the respiratory tract and triggers local anamnestic responses upon aerosol infection. *J Virol*. 2015;89(18):9581–90.
15. Pega J, Bucafusco D, Di Giacomo S, Schammas JM, Malacari D, Capozzo AV, et al. Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. *J Virol*. 2013;87(5):2489–95.
16. Marshak RR. Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J Natl Cancer Inst*. 1968;41:243–63.
17. Ministerio de Ganadería agricultura y Pesca (MGAP). Legislación Sanitaria Animal. Available at: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-legislacion-sanitaria,O,es,0>. Accessed 08 Dec 2015.
18. Bucafusco D, Di Giacomo S, Pega J, Juncos MS, Schammas JM, Perez-Filgueira M, et al. Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*. 2014;32(48):6576–82.
19. Maradei E, La Torre J, Robiolo B, Esteves J, Seki C, Pedemonte A, et al. Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*. 2008;26(51):6577–86.
20. Robiolo B, La Torre J, Duffy S, Leon E, Seki C, Torres A, et al. Quantitative single serum-dilution liquid phase competitive blocking ELISA for the assessment of herd immunity and expected protection against foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. *J Virol Methods*. 2010;166:21–7.
21. Trotta M, Lahore J, Cardoso N, Melucci O, Catena M, et al. Simultaneous immunization of cattle with foot-and-mouth disease (FMD) and live anthrax vaccines do not interfere with FMD booster responses. *Trials Vaccinol*. 2015;4:38–42.
22. Amills M, Norimine J, Olmstead CA, Lewin HA. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine*. 2004;28(1):25–8.
23. Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R. Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria*. 2013;191:29–37.
24. World Organization for Animal Health (OIE). Foot and mouth disease. In: Terrestrial animal health code. Paris: OIE; 2014. Available at: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmlfile=chapitre\\_fmd.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmlfile=chapitre_fmd.htm). Accessed 07 Dec 2015.
25. Patil PK, Sajjanar CM, Natarajan C, Bayry J. Neutralizing antibody responses to foot-and-mouth disease quadrivalent (type O, A, C and Asia 1) vaccines in growing calves with pre-existing maternal antibodies. *Vet Microbiol*. 2014;169(3–4):233–5.
26. Bucafusco D, Di Giacomo S, Pega J, Schammas JM, Cardoso N, Capozzo AV, et al. Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN- $\gamma$  responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology*. 2015;476:11–8.
27. Pyeon D, Splitter GA. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J Virol*. 1998;72(8):6917–21.
28. Estes DM, Brown WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;90(1–2):1–10.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





# Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

---

Montevideo, 14 de octubre de 2016

El Editor Jefe de la Revista *VETERINARIA (Montevideo)*, órgano oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, comunica que su trabajo:

**Diagnóstico molecular del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina basado en la técnica de Droplet Digital PCR**

Puentes R, Panei CJ, Folgueras-Flatschart AV, Gomes B, De Brun L, Leites M, Galosi C, Nicolini P, LLambí S, Flatschart RB

Ha sido recibido para su publicación en la revista. El mismo se enviará a revisores.

Muchas gracias por su valiosa colaboración

Dr. Daniel Cavestany, PhD  
Editor Jefe

1 Molecular diagnosis of bovine leukemia virus based on the Droplet Digital PCR

2  
3 Diagnóstico molecular del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina basado en la técnica  
4 de Droplet Digital PCR

5  
6 Puentes R<sup>1,\*</sup>, Panei C J<sup>3,4</sup>, Folgueras-Flatschart A V<sup>2</sup>, Gomes, B<sup>2</sup>, De Brun L<sup>1</sup>, Leites  
7 M<sup>1</sup>, Galosi C<sup>3,5</sup>, Nicolini P<sup>1</sup>, LLambí S<sup>1</sup>, Flatschart R B<sup>2</sup>.

8 <sup>1</sup>Facultad de Veterinaria – Universidad de la Republica - Uruguay;

9 <sup>2</sup>Instituto Nacional de Metrología, Calidad y Tecnología (Inmetro) - Brasil;

10 <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata –Argentina.

11 <sup>4</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

12 <sup>5</sup>Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de BsAs, Argentina.

13 \*autor para correspondencia: [rpuentes@adinet.com.uy](mailto:rpuentes@adinet.com.uy)

14  
15 Resumen

16 La técnica de *droplet digital* PCR (ddPCR) es una herramienta altamente sensible,  
17 desarrollada para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Permite detectar  
18 pequeñas diferencias porcentuales y cuantificar variantes raras, presentando ventajas  
19 importantes en comparación con las herramientas existentes. En este trabajo se describe  
20 por primera vez la utilización de la técnica de ddPCR para la detección de la presencia  
21 de ADN (provirus) del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (VLB). Se analizaron 67  
22 muestras de sangre de animales expuestos naturalmente al virus y se compararon los  
23 resultados con los obtenidos por nested PCR (nPCR). El 62,7% (42/67) de las muestras  
24 analizadas fue positiva por nPCR, mientras que el 89,5% (60/67) resultó positiva por

25 ddPCR. La media y la mediana del número de copias provirales en las muestras que  
26 fueron positivas por ddPCR y negativas por nPCR fue 23 y 21 copias provirales/uL de  
27 ADN, respectivamente. Para las muestras positivas por ambas técnicas dichos valores  
28 fueron de 2479 y 554 copias provirales/uL de ADN genómico, respectivamente. Esto  
29 evidencia que las muestras negativas por nPCR aun contendrían un número  
30 considerablemente bajo de copias de provirus que no están siendo detectadas. En  
31 conclusión, la ddPCR resultó ser una promisorio herramienta para la detección y  
32 cuantificación absoluta de VLB en sangre periférica de bovinos.

33 Palabras claves: Leucosis Bovina, nested PCR, PCR Digital.

34

35 Abstract

36 Droplet digital PCR (ddPCR) is a highly sensitive tool developed for the detection and  
37 quantification of nucleic acids. It can detect and quantify small percentage differences  
38 of rare variants, presenting significant advantages over existing tools. This paper  
39 describes for the first time the use of the ddPCR for detecting the presence of DNA  
40 (provirus) of the Bovine leukemia virus (BLV). Sixty seven blood samples from animals  
41 naturally exposed to the virus were analyzed and the results were compared with those  
42 obtained by nested PCR (nPCR). The 62.7% (42/67) of the samples was positive by  
43 nPCR, while 89.5% (60/67) were positive by ddPCR. The mean and median number of  
44 proviral copies samples that were positive by ddPCR and negative by nPCR was 23 and  
45 21 proviral copies/uL of genomic DNA, respectively. For positive values by both  
46 techniques the mean and median number of proviral copies samples were 2479 and 554  
47 proviral/uL copies of genomic DNA respectively. This shows that the negative samples  
48 by nPCR even contain considerably low number of copies of provirus that are not being

49 detected. In conclusion, the ddPCR turned out to be a promising tool for the detection  
50 and absolute quantification of BLV in peripheral blood of cattle.

51 Keywords: Bovine leukosis, nested PCR, PCR Digital.

52

### 53 Introducción

54 El virus de la Leucosis Enzootica Bovina (VLB) es el principal agente viral que afecta  
55 al ganado lechero en muchos países del mundo. El 60% de los animales infectados son  
56 asintomáticos, resultando en pérdidas productivas asociadas principalmente a la  
57 exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea, disminución de la  
58 longevidad del animal y disfunciones en el sistema inmune (Kabeya y col., 2001;  
59 Bartlett y col., 2013).

60 El VLB es un retrovirus que, al igual que el virus T-linfotrópico humano tipo I (HTLV-  
61 I), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus T-linfotrópico de simios  
62 (STLV), pertenece al género *Deltaretrovirus*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, familia  
63 *Retroviridae*. Es un virus ARN que afecta a células de la línea linfoide, principalmente a  
64 los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie. Luego de la  
65 infección el virus se integra al genoma celular en forma de provirus (ADN proviral). El  
66 VLB también persiste en otras células del sistema inmune como los monocitos y  
67 macrófagos.

68 Para el diagnóstico de VLB, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)  
69 recomienda el uso de las pruebas ELISA e Inmunodifusión en gel agar (IDGA) para la  
70 detección de anticuerpos y el aislamiento viral o PCR anidado (*nested* PCR, nPCR) para  
71 la identificación del agente (OIE, 2012). En los últimos años, se han desarrollado  
72 técnicas para la cuantificación de la carga proviral en células de animales infectados

73 utilizando *real time* PCR (qPCR) (Lew y col., 2004; Rola-Łuszczak y col., 2013). Si  
74 bien hasta el momento esta técnica no ha sido incluida entre los métodos de diagnóstico  
75 avalados por la OIE, la misma permitiría analizar la relación entre la cantidad de  
76 provirus (carga proviral) y el efecto de la misma en los animales infectados. Una  
77 cuantificación confiable de la carga proviral de VLB en sangre periférica y/u otros  
78 tejidos es relevante para comprender la biología del virus y la importancia que tiene el  
79 mismo en la patogénesis de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB). Sin embargo, la  
80 técnica de qPCR tiene limitaciones que pueden impedir la precisa y exacta  
81 cuantificación de la carga proviral (Hayden y col., 2013). Además, un enfoque indirecto  
82 mediante una curva estándar, no es lo más adecuado para la cuantificación de la carga  
83 proviral, especialmente por la falta de consistencia y fiabilidad que son aspectos  
84 esenciales para la detección de umbrales y cambios biológicamente significativos  
85 (Brunetto y col., 2014).

86 Una nueva técnica desarrollada en los últimos años denominada *digital droplet* PCR  
87 (ddPCR), permite la detección viral y la cuantificación absoluta de carga proviral con  
88 una alta sensibilidad sin necesidad de una curva estándar. La técnica aplica fundamentos  
89 tanto de la PCR convencional como de la qPCR. Brevemente, la mezcla de PCR junto  
90 con el ADN de interés, son fraccionados en miles de gotitas (*droplets*) de tamaño en el  
91 orden de los nanómetros, siendo luego amplificadas en un termociclador convencional.  
92 Posteriormente, todas las gotas son analizadas por señal de fluorescencia en un equipo  
93 especializado (Pinheiro y col., 2012). Cada *droplet* es definido como positivo o negativo  
94 según la amplitud de la señal fluorescente (Hindson y col., 2011). Finalmente,  
95 utilizando algoritmos basados en la distribución de Poisson, se determina el número

96 absoluto de copias en la muestra original con independencia de una curva estándar  
97 (Pinheiro y col., 2012).

98 Si bien esta nueva herramienta aun no ha sido utilizada en forma masiva para el  
99 diagnóstico de enfermedades virales en animales o en humanos, recientemente ha sido  
100 estandarizada para la cuantificación de HTLV-I y HIV (Brunetto y col., 2014; Trypsteen  
101 y col., 2016), ambos pertenecientes a la misma familia que el VLB.

102 EL objetivo de este trabajo fue aplicar la ddPCR para la detección de la forma proviral  
103 de VLB en animales naturalmente infectados y comparar los resultados con los  
104 obtenidos utilizando la actual técnica de referencia (nPCR).

105

106 Materiales y métodos

107 Selección de las muestras

108 Se seleccionaron al azar 67 muestras de ADN genómico bovino de un Banco de ADN  
109 Genómico Holando. Dichas muestras provienen de vacas de tambos comerciales de los  
110 Departamentos de Paysandú y Florida, Uruguay. Para la cuantificación del ADN se  
111 utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies,  
112 Inc.,Wilmington, DE). Las muestras se estandarizaron a una concentración final de 30  
113 ng/uL y fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

114

115 Muestras control

116 Como control positivo se utilizó ADN extraído de la línea celular FLK (*Fetal Lamb*  
117 *Kidney*) persistentemente infectada con VLB y el plásmido recombinante pGEM-T  
118 (gentilmente cedido por el Dr. Otto Pritsch del *Institut Pasteur* de Montevideo), que  
119 contiene una copia del gen *env* que codifica para la glicoproteína de superficie gp51 de



120 VLB (Moratorio y col., 2010). El número de copias de provirus fue calculado según el  
121 peso molecular del plásmido y la concentración de ADN existente. Como control  
122 negativo se utilizó ADN genómico ovino, ya que esta especie no se infecta naturalmente  
123 con VLB.

124

#### 125 Detección de VLB por nPCR

126 Se realizaron dos rondas de amplificación de un fragmento del gen *env* de VLB de  
127 acuerdo al protocolo descrito por Fechner y col. (1996), utilizando los *primers env* 5032  
128 (Forward): 5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' y *env* 5608 (Reverse): 5'-  
129 AACACAACCTCTGGGAA-3', para la primera ronda; y *env* 5099 (Forward): 5'-  
130 CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3' y *env* 5521 (Reverse): 5'-  
131 GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3' para la segunda ronda (anidada). El tamaño de  
132 los amplicones esperados en las muestras positivas) fue de 598 pb (primera ronda) y  
133 444 pb (segunda ronda). El producto final de amplificación (444 pb) fue visualizado  
134 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio.

135

#### 136 Detección de VLB por ddPCR

137 Para amplificar un segmento del gen *env* de VLB mediante ddPCR se utilizaron los  
138 *primers* (Forward: 5'-ATCATGGGCCCTGCTTTTAA-3'; Reverse 5'-  
139 AGGTTCCCAACATATAGCACAGTC-3') y sonda (6FAM 5'-  
140 TCAAACGGCACGGGCCTTCC-3'), descritos previamente por Lew y col. (2004).  
141 Para cada muestra, la reacción incluyó 2 uL de ADN genómico (60 ng), 0,6 uL de cada  
142 *primer* (10 nM), 0,3 uL de sonda FAM (10 nM) y 10 uL Bio-Rad 2× *Supermix*. La  
143 mezcla de reacción se emulsificó con el *droplet generator oil* (Bio-Rad, Hercules, CA)

144 usando un QX-200 *droplet generator*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las  
145 gotas fueron transferidas a una placa de 96 pocillos (Eppendorf, Hauppauge, NY), la  
146 cual se selló con un sellador de calor con láminas perforables (PX1™ PCR plate sealer  
147 – Bio Rad). La PCR se realizó en un termociclador C1000 TOUCH CYCLER w/96W  
148 FSRM (Bio-Rad, Hercules, CA) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial  
149 de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 30 seg a 59°C, y una extensión final de  
150 10 min a 98°C. Luego de la amplificación, la placa fue transferida al QX200 *droplet*  
151 *reader* (Bio-Rad, Hercules, CA) y cada pocillo fue analizado para determinar la  
152 cantidad de eventos positivos (gota fluorescentes). Los resultados fueron analizados  
153 mediante el software *QuantaSoft* version 1.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA) a través de  
154 gráficos de puntos.

155

156 Cálculo de la carga proviral de VLB en el ADN genómico bovino

157 Además del resultado cualitativo (negativo/positivo) obtenido para cada muestra  
158 mediante ddPCR, que permitió comparar los resultados con los obtenidos por nPCR,  
159 también se calculó la carga proviral mediante ddPCR (copias provirales/uL de ADN  
160 genómico) para cada muestra. Para cada experimento, el umbral de detección de  
161 fluorescencia se determinó manualmente, de acuerdo a los controles negativos  
162 (muestras sin ADN y muestras de ADN ovino). Las gotas positivas fueron determinadas  
163 por intensidad de fluorescencia utilizando el software *QuantaSoft* (Bio-Rad, Hercules,  
164 CA). Solo las gotas que superaron el valor umbral fueron contabilizadas como  
165 positivas. Los controles negativos se incluyeron en cada experimento, validando el  
166 ensayo cuando los mismos no presentaban gotas fluorescentes. Todas las muestras,

167 incluyendo los controles positivos y negativos, se realizaron por duplicado,  
168 expresándose el resultado como el promedio de las dos mediciones.

169

170 Análisis de los datos

171 Considerando el resultado de ambas pruebas juntas, se calculó la prevalencia de VLB en  
172 las muestras analizadas y tomando como referencia los resultados de la nPCR, se  
173 calculó la sensibilidad (verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos negativos),  
174 especificidad (verdaderos negativos/verdaderos negativos + falsos positivos), valor  
175 predictivo positivo – VPP (verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos positivos)  
176 y negativo – VPN (verdaderos negativos/ verdaderos negativos + falsos negativos), la  
177 precisión y el índice kappa de la técnica ddPCR, utilizando el software *Data Analysis*  
178 *Supplement for Excel™* (Office System 2010 for Windows™, Microsoft Corp).

179

180 Resultados

181 La Figura 1 muestra los resultados de la detección de un segmento del gen *env* de VLB  
182 mediante nPCR. El 62,7 % de las muestras analizadas (42/67) resultaron positivas para  
183 VLB (32 en la primera ronda y 10 en la segunda ronda de PCR).

184

185 En la Figura 2 se muestran los resultados cualitativos obtenidos por ddPCR. Sesenta  
186 muestras fueron positivas para VLB, presentando al menos una gota fluorescente. Por lo  
187 tanto, sobre el total de muestras analizadas (n=67), se encontró una prevalencia de  
188 89.5% de VLB por esta técnica. Por otro lado, cuando se compararon ambas técnicas,  
189 18 de las 25 muestras que fueron negativas por nPCR, resultaron positivas por ddPCR,  
190 es decir, la ddPCR detectó un 72% más de muestras positivas que la nPCR.

191

192 Respecto a la cuantificación de la carga proviral, en las muestras que fueron positivas  
193 para VLB por ddPCR (60/67) se detectó una gran variabilidad en el número de copias  
194 provirales, observándose un rango entre 12 y 49.500 copias provirales/uL de ADN  
195 genómico, con valores de media y mediana de 1742 y 111 copias/uL respectivamente.

196 En aquellas muestras que fueron positivas por ddPCR y negativas por nPCR (18/25), la  
197 variación en el número de copias provirales no solamente fue marcadamente menor  
198 (rango: 12 a 48 copias/uL), sino que el nivel de carga proviral observado fue muy bajo,  
199 con una media de 23 y una mediana de 21 copias/uL. Al comparar la carga proviral en  
200 las muestras positivas para ambas pruebas, se observó un amplio rango en el número de  
201 copias del provirus (10 a 49500 copias/uL), con una media de 2479 y una mediana de  
202 554 copias/uL.

203 Sin embargo, de las 60 muestras positivas por ddPCR, un total de 26 presentaron  
204 valores por debajo de 50 copias provirales/uL, donde tan solo 8 de estas (30%), fueron  
205 detectadas por nPCR.

206

207 Se construyó una tabla de contingencia (Tabla 1) con el fin de comparar los resultados  
208 de ambas pruebas y determinar la eficiencia relativa de las mismas. Tomando como  
209 prueba de referencia la nPCR para el diagnóstico de animales infectados con VLB, se  
210 estimó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 28% para la ddPCR. El nivel de  
211 concordancia entre ambas técnicas estimado por el índice kappa, fue aceptable ( $\kappa =$   
212 0.328) según la tabla de Landis y Koch (1977).

213

214

215    Discusión

216    La LEB es una de las principales virosis que afecta al ganado lechero a nivel mundial.  
217    Hasta la fecha, al menos 21 países han erradicado esta enfermedad, siendo aun  
218    endémica en varios países de todos los continentes (Bartlett y col., 2013; 2014). Desde  
219    el punto de vista clínico menos del 10% de los animales infectados con VLB desarrollan  
220    la forma tumoral de la enfermedad (linfosarcoma). Esto permite suponer que las  
221    técnicas de laboratorio son determinantes a la hora de diagnosticar animales infectados  
222    en forma subclínica, especialmente aquellos que presentan infecciones recientes o que  
223    tienen baja carga proviral. De esa manera, el diagnóstico precoz de VLB es clave para  
224    disminuir su transmisión y las pérdidas productivas indirectas asociadas a esta  
225    enfermedad.

226    Desde el punto de vista serológico, la detección de anticuerpos mediante ELISA e  
227    IDGA son las técnicas de referencia por la OIE (2012). Sin bien existe variación en la  
228    sensibilidad diagnóstica cuando utilizamos pruebas serológicas, estas son muy útiles  
229    sobre todo en programas de control de la enfermedad con muestreos sistemáticos o en  
230    regiones donde la prevalencia es muy alta (Furtado y col., 2012). En este trabajo, no fue  
231    posible comparar las técnicas de nPCR y ddPCR con las pruebas serológicas, aunque  
232    está bien determinado que la nPCR es más sensible que el ELISA o IDGA para el  
233    diagnóstico de VLB, sobre todo en infecciones recientes (OIE, 2012) o en determinados  
234    estados fisiológicos del animal (Rama y col., 2010).

235    Respecto a las técnicas moleculares, varios autores han descrito la utilización de la PCR  
236    para detectar el provirus de VLB en el genoma bovino y es una herramienta avalada por  
237    la OIE (2012). Esta técnica, si bien del punto de vista práctico no se aplica para hacer  
238    diagnóstico de rutina en números elevados de animales, es más sensible que las pruebas

239 serológicas y puede ser útil para determinar la infección por VLB en casos de animales  
240 calostrados, con infecciones recientes o cuando los resultados no son concluyentes por  
241 ELISA o IDGA. Aunque la prueba de nPCR tiene una sensibilidad teórica para detectar  
242 una molécula de ADN proviral, en la práctica es aceptado que la sensibilidad analítica  
243 es algo más baja, alrededor de 5-10 moléculas de ADN proviral por muestra (OIE,  
244 2012). Una desventaja de esta prueba, al igual que todas las PCR a tiempo final, es que  
245 no permite cuantificar la carga proviral existente en los animales positivos. Es por eso  
246 que desde hace ya algunos años, se desarrollaron técnicas cuantitativas como la qPCR.  
247 La misma ha sido utilizada con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la nPCR, así  
248 como para cuantificar la carga proviral en los animales infectados (Lew y col., 2004;  
249 Jimba y col., 2012; Rola-Luszczak y col., 2013). Sin embargo, la técnica de qPCR, ya  
250 sea utilizando agentes intercalantes inespecíficos de ADN como SYBR Green o sondas  
251 específicas, posee desventajas relacionadas con la necesidad de una curva estándar para  
252 la cuantificación relativa de la carga viral, lo que en el caso de VLB puede ser muy  
253 limitante teniendo en cuenta que se trata de un provirus que está inserto en el ADN  
254 genómico bovino. Generalmente en estos sistemas, se han utilizado plásmidos  
255 recombinantes con una copia del gen de interés, para la realización de la curva estándar,  
256 lo que podría limitar la consistencia y fiabilidad de los resultados frente a la muestra  
257 real (Brunetto y col., 2014). En la actualidad, si bien diversos grupos de investigación  
258 emplean esta técnica como diagnóstico de VLB, la misma no se encuentra dentro de las  
259 pruebas de referencia de la OIE.

260 La ddPCR, conocida también como la “tercera generación” de PCR, es una nueva  
261 herramienta para la detección y cuantificación viral absoluta que combina fundamentos  
262 de la PCR convencional y de la qPCR. Presenta ventajas importantes sobre ambas

263 técnicas, lo que ha llevado a que se comience a utilizar en diversos países con resultados  
264 interesantes y muy prometedores, siendo considerada una herramienta accesible y  
265 potente para detectar pequeñas cantidades de material genético con un rendimiento  
266 superior a otros métodos cuantitativos (Brunetto y col., 2014), Los resultados  
267 reportados con la aplicación de la ddPCR en el campo de la investigación sobre el  
268 cáncer, las pruebas prenatales, la medicina de trasplantes y el diagnóstico virológico,  
269 han hecho de esta tecnología una herramienta con creciente uso a nivel global y  
270 excepcionalmente robusta para la cuantificación precisa y sensible de ácidos nucleicos  
271 (Brunetto y col., 2014; Hudecova, 2015; Trypsteen y col., 2016).

272 En este sentido, en el presente trabajo se comunica la estandarización por primera vez  
273 de la ddPCR para la detección de la forma proviral de VLB en animales expuestos al  
274 virus naturalmente. Esta técnica fue comparada con la nPCR, única prueba molecular de  
275 referencia para el diagnóstico de VLB reconocida por la OIE. Como hallazgo más  
276 importante, se puede destacar que la ddPCR detectó un 30% más (n=18) de muestras  
277 positivas que la nPCR.

278 Asimismo, la observación de que la media de la carga proviral en muestras ddPCR+/  
279 nPCR- es muy baja (23 copias/uL), evidencia que las muestras negativas por nPCR  
280 contendrían un número considerablemente bajo de copias del provirus que no están  
281 siendo detectadas por esta técnica pero sí en cambio, por la ddPCR.

282

## 283 Conclusiones

284 La ddPCR promete ser una técnica altamente aplicable en salud animal para establecer  
285 programas de erradicación de diferentes virosis, teniendo en cuenta que es una técnica  
286 que permite la cuantificación absoluta, no requiriendo el uso de controles estándares o

287 curvas de calibración. Además se plantea la necesidad de compararla con la qPCR en  
288 futuros ensayos con VLB, que permitan correlacionar la carga proviral entre ambas  
289 técnicas.

290 Los resultados obtenidos en este trabajo revelan la importancia de aumentar la  
291 sensibilidad de las pruebas diagnósticas para VLB, con el objetivo de poder detectar  
292 aquellos animales falsos negativos por otros tests, sobre todo por aquellos considerados  
293 de referencia por la OIE.

294

#### 295 Bibliografía

- 296 1. Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT, Erskine RJ.  
297 Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.*  
298 2013;96(3):1591-7.
- 299 2. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL,  
300 Zalucha J, Erskine RJ. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy  
301 cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2014;244(8):914-22.
- 302 3. Brunetto GS, Massoud R, Leibovitch EC, Caruso B, Johnson K, Ohayon J,  
303 Fenton K, Cortese I, Jacobson S. Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise  
304 quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral  
305 blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral  
306 mutations. *J Neurovirol.* 2014;20(4):341-51.
- 307 4. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D.  
308 Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of  
309 bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl  
310 Veterinarmed B.* 1996;43(10):621-30.



- 311 5. Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R. Leucosis Bovina  
312 Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay.  
313 Veterinaria (Montevideo). 2013;191:29-37.
- 314 6. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM.  
315 Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of  
316 cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):540-6.
- 317 7. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz  
318 AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR,  
319 Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen  
320 JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA,  
321 Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP,  
322 White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston  
323 BW. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of  
324 DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83:8604–10.
- 325 8. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem*.  
326 2015;48(15):948-56.
- 327 9. Jimba M, Takeshima SN, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsubishi T,  
328 Ohmori T, Nunoya T, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating  
329 bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res*. 2012;8:167.
- 330 10. Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. Host immune responses in the course of bovine  
331 leukemia virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*.  
332 2001;63:703–708.
- 333 11. Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. Sensitive  
334 and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR

- 335 using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. J Virol Methods.  
336 2004;115(2):167-75.
- 337 12. Moratorio G, Obal G, Dubra A, Correa A, Bianchi S, Buschiazzo A, Cristina J,  
338 Pritsch O. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South  
339 America reveals diversification in seven distinct genotypes. Arch Virol.  
340 2010;155(4):481-9.
- 341 13. OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Enzootic Bovine  
342 Leukosis. In: Terrestrial animal health code [online]. Paris: OIE; 2012. Available  
343 at:  
344 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_EBL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf).  
345 [Accessed 02 Agosto. 2016.](#)
- 346 14. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S,  
347 Emslie KR. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for  
348 DNA copy number quantification. Anal Chem. 2012;84(2):1003-11.
- 349 15. Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A,  
350 Pritsch O. Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis  
351 Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la  
352 fórmula leucocitaria. Veterinaria (Montevideo). 2010;46(177-180):15-22.
- 353 16. Rola-Łuszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuźmak J.  
354 Development of an improved real time PCR for the detection of bovine  
355 leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive  
356 serological test results. J Virol Methods. 2013;189(2):258-64.

357 17. Trypsteen W, Kiselina M, Vandekerckhove L, De Spiegelaere W. Diagnostic  
358 utility of droplet digital PCR for HIV reservoir quantification. *J Virus Erad.*  
359 2016;2(3):162-9.

## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Doctorado

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Salón de Posgrados, 13 de diciembre de 2016

**TRIBUNAL:** Dr. Franklin Riet-Correa (Presidente), Dra. Silvia Hubner, Dra. Jacqueline Maisonnave

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
2.645358-0	PUENTES PALOMBO, Rodrigo E.	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

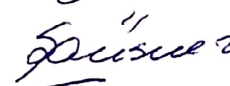
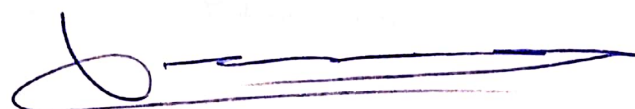
### TRIBUNAL

Dr. Franklin Riet-Correa (Presidente)

Dra. Silvia Hubner

Dra. Jacqueline Maisonnave

### FIRMA

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)