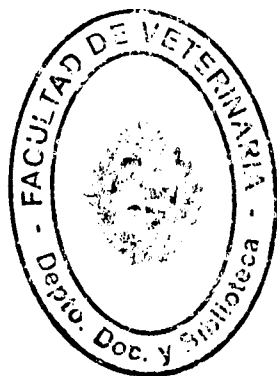


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ASOCIACIÓN ENTRE LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA Y LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL NATURAL CONTRA ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE
INTERÉS REPRODUCTIVO**

Por

**Marcos MIONETTO CABRERA
Adrián Federico RODRÍGUEZ TERRA**



TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

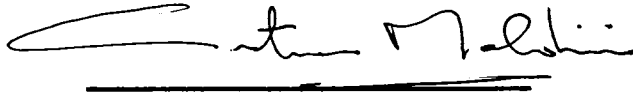


FV-33204

PÁGINA DE APROBACIÓN

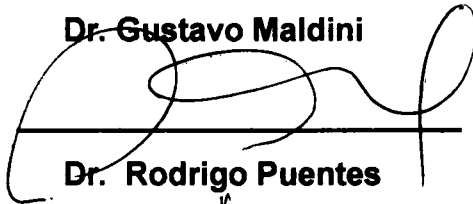
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Gustavo Maldini

Segundo miembro:



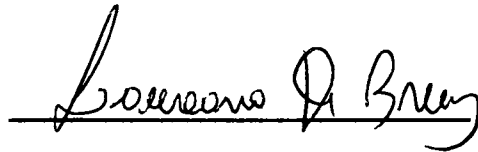
Dr. Rodrigo Puentes

Tercer miembro:



Dr. Uruguaysito Benavides

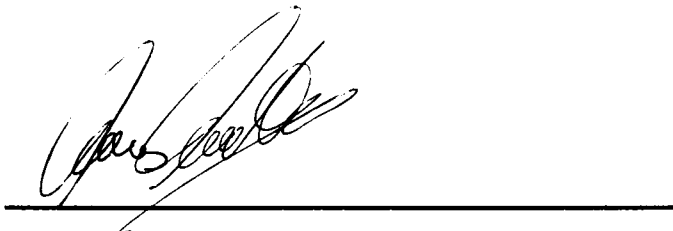
Cuarto miembro:



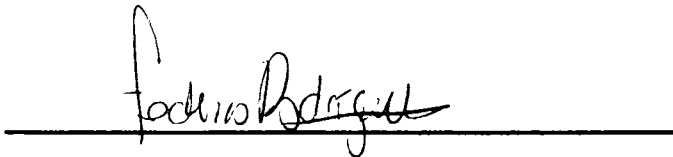
Dra. Laureana De Brun

Fecha:

Autores:



Marcos Mionetto Cabrera



Federico Rodríguez Terra

FACULTAD : 177

Aprobado con 12 (Doce)

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor el Dr. Rodrigo Puentes y nuestra co-tutora la Dra. Laureana De Brun por dedicarnos parte de su tiempo y sus conocimientos en la realización de este trabajo, que representa el último escalón de nuestra etapa de estudiantes universitarios.

Al área de inmunología y virología por facilitarnos las instalaciones, al personal de biblioteca por su tiempo en la búsqueda de información.

A nuestras familias, amigos y compañeros que fueron parte fundamental en este periodo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY.....	7
3. Introducción.....	8
4. Revisión bibliográfica.....	9
4.1 Descripción de los agentes.....	9
4.1.1 Leucosis Bovina Enzootica.....	9
4.1.2 IBR (Rinotraqueitis infecciosa bovina).....	12
4.1.3 BVD (Diarrea Viral Bovina).....	14
4.1.4 BoHV-4 (Herpesvirus bovino tipo 4).....	17
4.1.5 LEPTOSPIROSIS.....	18
4.1.6 BRUCELOSIS.....	20
4.1.7 CLAMIDIOSIS.....	21
4.1.8 NEOSPOROSIS.....	23
4.2 IMPORTANCIA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA.....	24
4.3 VLB Y LA RESPUESTA INMUNE.....	25
5. Hipótesis.....	27
6. Objetivos.....	27
6.1 Objetivo General.....	27
6.2 Objetivos Específicos.....	27
7. Materiales y métodos.....	27
8. Resultados.....	39
9. Discusión y Conclusiones.....	35
10. Bibliografía.....	37

Lista de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Seroprevalencia al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica, total y clasificada por departamento en estudio.....30

Figura 2. Número de animales seropositivos a Leptospirosis según los serovares.....31

Figura 3. Prevalencia por enfermedad según serología al virus de la Leucosis bovina (VLB).....33

Figura 4. Relación entre virus de la Leucosis bovina (VLB) y Herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1).....34

Figura 5. Relación entre virus de la Leucosis bovina (VLB) y leptospira.....34

Tablas

Tabla 1. Serología contra BoHV-4.....30

Tabla 2. Serología contra Clamidia del total de muestras analizadas.....32

Tabla 3. Serología contra Neospora del total de muestras analizadas.....32

Tabla 4. Situación serológica para cada enfermedad en la población.....32

1. Resumen

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa de distribución mundial predominando mayoritariamente en los rodeos lecheros. Es causada por un Retrovirus denominado virus de la leucosis bovina (VLB) que afecta principalmente a los linfocitos B de los bovinos. La misma puede presentarse de forma asintomática en un gran porcentaje de animales (60%), en forma de linfocitosis persistente (30–35%) o en su forma tumoral de presentación clínica denominada linfosarcoma (5–10%) siendo mortal. Se ha demostrado que la infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune que impacta directamente en la sanidad, además de disminuir la producción de leche y produciendo pérdidas indirectas por refugos o muerte a causa de otras patologías. El objetivo de este trabajo fue analizar si existe alguna relación entre animales seropositivos a VLB y la seroconversión natural contra Diarrea Viral Bovina (BVD), Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1), Herpes Virus Bovino tipo 4 (BoHV-4), Clamidiosis, Leptospirosis, Brucelosis y Neosporosis. Para esto se procesaron aproximadamente 700 muestras de un banco de suero de bovinos de leche existente en el Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria. Se utilizaron las técnicas de referencia indicadas por la Organización internacional de sanidad animal (OIE) para cada enfermedad y los resultados fueron relacionados con la respuesta inmune contra VLB. Se encontraron asociaciones a campo entre serología positiva a VLB y la presencia de anticuerpos contra BoHV-1 ($p=0,002$) y *Leptospira* spp ($p=0,028$). Más ensayos son necesarios para confirmar los hallazgos aquí descritos y determinar si VLB podría participar indirectamente en la performance reproductiva en ganado de leche. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de Leucosis bovina, demostrar el efecto “oculto o silencioso” que pueda tener el virus en nuestros rebaños, podría ayudar a entender algunos procesos o pérdidas existentes que al día de hoy no tienen claras explicaciones.

2. Summary

Enzootic Bovine Leukosis (LBE) is an infectious disease of worldwide distribution, predominantly in dairy herds. It is caused by a retrovirus called bovine leukosis virus (VLB) that mainly affects the B lymphocytes of cattle. It can be asymptomatic in a large percentage of animals (60%), in the form of persistent lymphocytosis (30-35%) or in its tumoral form of clinical presentation called lymphosarcoma (5-10%) being fatal. It has been shown that subclinical infection causes important dysfunctions of the immune system that directly impacts on health, in addition to diminishing milk production and producing indirect losses due to refuges or death due to other pathologies. The objective of this work was to analyze if there is any relationship between animals seropositive to VLB and the natural seroconversion against Bovine Viral Diarrhea (BVD), Bovine Herpes Virus type 1 (BoHV-1), Bovine Herpes Virus type 4 (BoHV-4), Chlamydiosis, Leptospirosis, Brucellosis and Neosporosis. For this, approximately 700 samples were analyzed from an existing milk cattle serum bank in the Department of Microbiological Sciences of the Faculty of Veterinary Medicine. The reference techniques indicated by the International Organization for Animal Health (OIE) for each disease were used and the results were related to the immune response against VLB. Field associations were found between serology positive for VLB and the presence of antibodies against BoHV-1 ($p = 0.002$) and *Leptospira* spp ($p = 0.028$). More trials are needed to confirm the findings described here and to determine if VLB could participate indirectly in reproductive performance in dairy cattle. Taking into account the high prevalence of bovine leukosis, demonstrating the "hidden or silent" effect that the virus may have on our herds could help to understand some existing processes or losses that today have no clear explanations.

2. Introducción

Leucosis Bovina Enzootica (LBE) es una enfermedad infecto contagiosa, causada por un Retrovirus de la familia *Retroviridae* que afecta células de la línea linfóide, principalmente a los linfocitos B. Es de gran importancia a nivel mundial debido a su amplia distribución e incidencia, especialmente en los sistemas de producción lechera (Lüchter, 2004).

Se puede observar tres formas de presentación de la enfermedad, habitualmente la forma tumoral afecta a bovinos mayores de dos años, con el pico mayor de incidencia entre los 5 y 8 años (Lewin y col., 1989). La forma inaparente ocurre en un elevado porcentaje de los animales del establecimiento (60%), pero además puede evolucionar a una linfocitosis persistente (35%) o finalmente el desarrollo tumoral con la formación de linfosarcomas (5%) (Fenner y col., 1992).

La principal vía de transmisión del virus es la horizontal, post natal. La forma de transmisión bovino a bovino es a través de materiales contaminados con sangre de animales infectados, ya sea por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intradérmica. Consecuencia de esto es el alto riesgo para la transmisión constituido por vacunaciones, castraciones, descornes, caravaneo, cirugías, palpación rectal, entre otras. Además se ha demostrado la transmisión horizontal mediante los artrópodos hematófagos (Buxton 1982).

En cuanto a la distribución de la enfermedad en el Uruguay, la prevalencia serológica en rodeos lecheros adultos puede variar entre 11% hasta un 75%, según la zona estudiada (Zaffaroni y col., 2007, Furtado y col., 2012), habiéndose reportado incluso recientemente seroprevalencia de 50% en vaquillonas holando jóvenes (aproximadamente 8 meses) (De Brun y col., 2013). Es una enfermedad que ha ido aumentando en el país, fundamentalmente por la alta difusión horizontal y por la selección negativa que se realiza desde hace varias décadas con la exportación de animales libres de la enfermedad.

Del punto de vista del impacto de VLB sobre las funciones del sistema inmune de los bovinos, se ha demostrado que la infección subclínica causa disfunciones inmunológicas importantes que impacta directamente en la sanidad del animal. Se ha visto que las células T infectadas con el virus aumentan la expresión de receptores inmunoinhibitorios, aumentando la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo, aumentando la expresión de IL-10 o disminuyendo la de IFN gamma. La expresión de los receptores inmunoinhibitorios están correlacionados positivamente con la carga pro viral (Bartlett y col., 2014). También se ha demostrado, a nivel del sistema inmune innato, una disminución de la función de los polimorfonucleares *in vitro* (a nivel del estallido oxidativo) inducido por *E. coli* en vacas infectadas con VLB (Souza y col., 2012).

En animales infectados subclínicamente, el virus no solo causa inmunodepresión sino que además genera disturbios inmunológicos a nivel de la respuesta inmune 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. Erskine y col. (2011), en ensayos a campo, encontraron que vacas infectadas con VLB tuvieron un menor título de IgG2 contra J5 *E. coli*, (vacuna utilizada contra la mastitis) comparando con vacas no infectadas y recientemente

nuestro grupo encontró una disminución de IgM e IgG1 en la respuesta a la vacunación contra el virus de la fiebre aftosa en animales seropositivos al VLB (Puentes y col., 2016b). En este sentido, la presente propuesta focaliza a evaluar si existe alguna relación natural entre la seropositividad contra VLB en animales asintomáticos y la respuesta inmune de bovinos contra enfermedades de la reproducción (BoHV-1, BVD, BoHV-4, Leptospirosis, Neosporosis, Clamidiosis y Brucelosis bovina).

Sobre las enfermedades reproductivas que se analizaron en este proyecto, la gran mayoría de ellas han sido diagnosticadas en mayor o menor medida como causa de abortos en Uruguay o al menos han sido detectados animales seropositivos; con excepción de BoHV-4 que se desconoce la situación epidemiológica en el país. BoHV-1 y BVD son las dos principales virosis que afectan la reproducción en bovinos a nivel mundial. En Uruguay están ampliamente difundidas en rodeos lecheros. La vacunación contra estos dos virus en el país no es obligatoria, pero se realiza desde hace varias décadas. Sin embargo ambas enfermedades siguen teniendo una alta prevalencia, estimadas en aproximadamente 36% y 77% para BoHV-1 y BVD respectivamente y a nivel de establecimientos alrededor del 99% para BoHV-1 y 100% para BVD, lo que demuestra una altísima difusión de ambas enfermedades (Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008). *Leptospira spp.* por otro lado es la principal bacteria que causa abortos en bovinos en Uruguay, además de producir nacimientos prematuros e infertilidad y patologías no reproductivas como septicemia y nefritis. Se considera que es la enfermedad zoonótica de mayor diseminación a nivel mundial. Otra zoonosis bacteriana de importancia y que se estudió en este trabajo, es la brucelosis producida por *Brucella abortus*, enfermedad bajo campaña sanitaria oficial que cursa principalmente con abortos sobre todo en el último tercio de la gestación. En otro sentido, se estudió también la neosporosis como enfermedad reproductiva de origen parasitario de mayor importancia en nuestro país y que ha tenido mucha relevancia en las últimas décadas como causa de abortos en vacas. Por último, la Clamidiosis (producida por *Chlamydophila abortus*) es otra de las posibles causas de fallas reproductivas en vacas que en Uruguay que no ha sido estudiada en profundidad, pero hace algunos años se encontraron bovinos lecheros seropositivos (Cattáneo y col., 2009) y por esa razón se incluyó en este ensayo.

4. Revisión Bibliográfica

4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS AGENTES

4.1.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad producida por un retrovirus denominado Virus de la leucosis bovina (VLB) que infecta preferentemente a los linfocitos B de bovinos, y afecta en mayor medida a los sistemas de producción intensivos como los tambos (De la Sota, 2004). La infección del VLB se caracteriza por un largo período de incubación, por la falta de sitios definidos de integración al genoma de la célula huésped, y la evolución oncogénica en una pequeña proporción de los individuos infectados (Kettmann y col; 1994). La mayoría de los animales infectados (60%) son portadores asintomáticos del virus, siendo posible detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra antígenos virales, o la presencia de ADN proviral en los linfocitos afectados (animales aleucémicos). Aproximadamente entre

un 30 y 35% de los animales infectados presentan linfocitosis persistente (LP) caracterizada por una expansión policlonal de linfocitos B CD5+. Finalmente, entre un 5 y 10% de los bovinos infectados desarrollan linfosarcoma, caracterizado por la presencia de tumores (Burny y col., 1988; Kettmann y col., 1994).

Etiología. El VLB es un retrovirus exógeno que junto con el virus T-linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV) pertenece al género Deltaretrovirus, subfamilia Ortoretrovirinae, familia Retroviridae. Es un virus ARN que afecta células de la línea linfoide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie. El virus también persiste en células como los monocitos y macrófagos (Kettmann y col., 1994). La partícula viral tiene un diámetro que varía entre los 60 y los 125 nm, está constituida por un núcleo electrodenso central rodeado por la envoltura viral (Gillet y col., 2007). El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARN de polaridad positiva unidos por su extremo 5' e integrado por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, los cuales son necesarios para su síntesis, además comparte con otros deltaretrovirus la región X (OIE, 2012). Los genes *gag*, codifican la proteína estructural p24 de la cápside, blanco de los anticuerpos; también codifican la p15 de la matriz, que interactúa con la bicapa lipídica de la membrana viral, y la proteína p12 de la nucleocápside. Los genes *pol* codifican la transcriptasa reversa, una ADN polimerasa, ARN dependiente. Los genes *env* codifican proteínas de la envoltura, la gp51 y gp30 (Johnson y Kaneene, 1992). Gp51 induce una expresión masiva de anticuerpos específicos en animales infectados (Gillet y col., 2007). La mayor parte de las pruebas serológicas rutinarias, detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana (OIE, 2012).

Situación en Uruguay. En nuestro país la LBE afecta principalmente al ganado lechero. Uruguay se ha transformado en un país exportador de lácteos, los productos que se exportan son fundamentalmente: leche en polvo, quesos, leche UHT, manteca, dulce de leche y suero de queso concentrado (MGAP; 2012). La LBE tiene un impacto significativo desde el punto de vista económico, debido al descenso en la productividad y la pérdida de mercados internacionales, relacionado a: a) mortalidad causada directamente por la forma tumoral de la enfermedad (linfosarcoma); b) alteración del sistema inmune del ganado infectado; c) aumento del uso de medicamentos veterinarios; d) restricciones en la exportación de ganado en pie, semen, embriones infectados (Felmer y col., 2006; Bartlett y col., 2013). La prevalencia en Uruguay ha ido en aumento con el correr de los años. Mederos e Irigoyen en 1996 obtuvieron una prevalencia de 20%, de un estudio de 30 predios diferentes en el Noreste del país; Gil y col. en 1998 obtuvieron una prevalencia de 46,6% en 53 diferentes establecimientos ubicados en Florida; Zaffaroni y col. en el año 2003 en diferentes departamentos Colonia (57%), Florida (72%) y San José (71%) en rodeos de la cuenca lechera; en 2012, Furtado y col. realizaron un ensayo en los departamentos de Florida, Tacuarembó y Durazno el cual la prevalencia pudo llegar a 77%; y De Brun y col. en el año 2014 una prevalencia de 50% en terneras en el momento del ingreso al campo de cría, aumentando a un 73% al egreso (18 meses) del mismo de Florida. Se sugirió que la falta de programas de control de esta enfermedad, sumado al programa de vacunación contra Fiebre Aftosa desde 2001, y la exigencia de libre de VLB por los mercados internacionales; podrían explicar el aumento de la prevalencia, y la concentración de animales positivos (Zaffaroni y col., 2007).

Transmisión: el virus se transmite en forma horizontal y vertical, siendo la primera la más importante. El contagio se produce por el traspaso de linfocitos que contienen el virus, de un animal infectado a uno susceptible. Estos se encuentran en sangre, calostro, leche, saliva, secreciones nasales, semen y orina (Gillet y col., 2007). Es importante el contagio mediante maniobras tales como la extracción de sangre, vacunaciones y tacto rectal, en las cuales se trabaja con un elevado número de animales utilizando el mismo instrumental repetidamente, es decir la vía iatrogénica (Gillet y col., 2007). En la transmisión vertical es importante la vía lactógena, en la cual el virus infecta los linfocitos B de las Placas de Peyer, y a partir de ahí se disemina (Den Broeke y col., 2001), además el virus puede cruzar la placenta.

Signos Clínicos: En los bovinos pueden distinguirse tres fases después del contagio con VLB: A) una fase inaparente, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y la producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales, principalmente la glicoproteína gp51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989). B) Linfocitosis persistente desarrollada por un 30 a 70 % de los animales infectados con edades entre 3 y 6 años, que desde el punto de vista clínico parecen estar sanos (Beier, 2008). Se define Linfocitosis persistente como un aumento en el recuento de linfocitos superior a 3 desvíos estándar sobre la media (Marshak, 1968) y se acepta como persistente al demostrar linfocitosis en 2 muestras analizadas separadas en el tiempo por un periodo de 60 a 90 días (Bendixen, 1963). C) Enfermedad tumoral propiamente dicha presente entre un 0,1% y 10% de los animales infectados y que es la forma irremediablemente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988).

La estrategia replicativa del VLB involucra, como primera fase, el reconocimiento específico de las proteínas externas de la envoltura viral por parte de la célula huésped, y la penetración a través del mecanismo de fusión (Bresseur y col., 1988). En el citoplasma se sintetiza una copia de ADN complementario a partir del ARN viral utilizando la enzima transcriptasa reversa. Las secuencias presentes a ambos extremos del genoma viral se repiten en cada extremo del nuevo ADN dando lugar a los extremos terminales o LTRs. La nueva molécula de ADN penetra al núcleo celular, se duplica, se circulariza y se integra al azar y en forma permanente, al genoma celular en forma de provirus (Luciw y Leung, 1994).

Inmediatamente después de la infección, la expresión genética y la producción de viriones maduros se activa en la célula huésped y se puede identificar una viremia pasajera que dura de 10 a 12 días post-infección (Schwartz y col., 1994), después de lo cual aparece una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones activos en los órganos de los animales infectados. Durante el primer mes post infección, las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos (Fulton y col., 2006). Uno de los indicadores más tempranos de infección es el aumento de la respuesta humoral antiviral entre la primera y octava semana postinoculación. Los anticuerpos reconocen los epítopes de gp51 y p24 y colaboran con la muerte de las células productoras de virus (Gillet y col., 2007). Los animales con LP no presentan otro signo que valores anormales de linfocitos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos animales sufren un desorden inmunológico, con cambios en el tipo de respuesta de linfocitos T CD4, modificando el perfil de citoquinas presentes en los animales (Kabeya y col., 2001).

La sintomatología causada por el linfosarcoma es inespecífica y variable, ya que depende de la localización del proceso neoplásico y del grado de afección de órganos de importancia vital (Chamizo, 2005). Se observa astenia, adelgazamiento, disminución del apetito, fatiga, disminución del rendimiento lácteo, anemia. Las adenopatías o tumefacciones ganglionares constituyen el signo característico, no siempre simétricas ni generalizadas (De la Sota, 2004). Estas lesiones pueden determinar una serie de trastornos funcionales de origen mecánico como compromiso de los bronquios, disnea, compresión del nervio vago, del esófago produciendo meteorismo crónico, del corazón con edemas e hidropesías del timo, de médula espinal con parálisis posterior, y de los ojos produciendo exoftalmia.

Diagnóstico. En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: Seroneutralización (SN), Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión doble en gel agar (IDGA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot (WB) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Gallo y col., 1990; Rodak y col., 1997). En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación de la LBE. El diagnóstico se realiza rutinariamente por métodos serológicos. La IDGA ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad. Se desarrollaron distintos kits comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche (Reichel y col., 1998). PCR es una prueba conveniente para detectar ADN proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano (Heeney y col., 1998). Son estas técnicas las recomendadas por la OIE tanto para el diagnóstico serológico (IDGA y ELISA), como la nested PCR para la identificación viral (OIE 2014).

Todas las técnicas indirectas (ID, ELISA-I, WB) y directa (PCR), son apropiadas para la detección de infección (variando en la sensibilidad). La técnica de IDGA y ELISA son apropiadas para aplicar a nivel poblacional (planes de control y erradicación). WB y PCR son pruebas alternativas para casos en que se requiera confirmación, siendo esta última la apropiada para detección directa del virus (González y col., 2001). En los últimos años se ha incorporado el uso de Real-time PCR al diagnóstico de VLB (Kuckleburg y col., 2003).

4.1.2 IBR (Rinotraqueitis infecciosa bovina)

La Rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa, causada por el Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), es una enfermedad del ganado bovino doméstico y silvestre. El virus está distribuido por todo el mundo. La enfermedad se caracteriza por síntomas clínicos del tracto respiratorio superior, como descargas nasales muco-purulentas y conjuntivitis. Los síntomas generales son fiebre, depresión, inapetencia, aborto y reducción de la producción de leche. El virus también puede infectar el tracto genital y originar vulvovaginitis pustular y balanopostitis. El análisis post-mortem revela rinitis, laringitis y traqueítis. La mortalidad es baja. Muchas infecciones siguen un curso subclínico. Las infecciones bacterianas secundarias pueden ocasionar una enfermedad respiratoria más grave (Avila y col., 2008)

Etiología. El agente causal de IBR es el Herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1) que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Fauquet y col.,

2005). Es un virus envuelto, ADN doble cadena lineal y una cápside icosaédrica. La cápside está rodeada por tegumento, y alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Murphy y col., 1999). En la envoltura están localizadas alrededor de 12 glicoproteínas con importante papel en la patogenicidad y en la inmunidad, tal es el caso de gB, gC, gD y gE (Engels y Ackermann, 1996; Kaashoek y col., 1998).

Situación en el país. En nuestro país, el virus fue aislado por primera vez en el año 1982 (Guarino y col., 1982), y a partir de esa fecha se han detectado varias cepas, tanto de animales con problemas respiratorios como reproductivos. De acuerdo a estudios de prevalencia serológica llevados a cabo en determinadas zonas del país, la infección estaría ampliamente distribuida tanto en ganado de carne como lechero (Saizar, 1997; Mederos, 1998; Guarino y col., 2008).

Transmisión. La principal vía de transmisión es el contacto directo entre animales a través de secreciones nasales, oculares o genitales de un bovino infectado, y por el uso de semen de toros infectados (Fenner y col., 1993; Engels y col., 1996). Los herpesvirus tienen la característica de permanecer en forma latente en el animal infectado, por lo que todo animal seropositivo por infección, es portador del virus en forma latente y un posible diseminador de la infección en el rodeo (Fenner, 1993; Guarino, 1997)

Signos clínicos. Se han descrito para BoHV-1 una amplia variedad de signos clínicos como consecuencia de su acción sobre los sistemas respiratorio, genital, digestivo y nervioso (Straub, 2001). Principalmente afecta el tracto respiratorio y genital tanto del ganado silvestre como del doméstico y causa un conjunto de síndromes clínicos tales como conjuntivitis, aborto, enteritis e infecciones sistémicas en animales jóvenes (Arboleda y col., 1996).

En las vacas la forma genital produce IPV (Vulvovaginitis pustular infecciosa) y en los toros IPB (Balanopostitis Pustular Infecciosa). Se caracterizan por enrojecimiento y edema con pequeñas pústulas que al desprenderse dejan una zona erosionada. Presentan secreción mucopurulenta abundante tanto en la mucosa de la vulva como del pene (Obando, 1994).

Puede producir infecciones latentes, lo cual tiene una significativa importancia epizootológica dado el peligro que representan los animales sin manifestaciones clínicas y serológicamente negativos, pero que pueden liberar virus bajo condiciones de estrés, siendo esto un riesgo de infección permanente para otros animales (Jones y col., 2006). En cuanto a la inmunidad, la respuesta inmune a BoHV-1 comienza desde que el virus se replica. El número de células citóxicas naturales y las secreciones, tanto nasales como vaginales de interferón (INF) tipo I, se incrementan y pueden estar relacionados con una protección local inmediata en estadios tempranos de la infección (Babiuk y col., 1996).

Respuesta inmune. La respuesta inmune adaptativa ocurre a los siete días postinfección. Los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra las glicoproteínas de la envoltura y probablemente sean importantes en la inmunidad a largo plazo (De Regge y col., 2006). Los anticuerpos producidos por vacunación con BoHV-1 persisten a niveles detectables durante tres años y los maternos durante 123 días tras el destete (Hage y col., 1998 y Fulton y col., 2004). La respuesta inmune mediada por células frente a este virus, incluye la producción por los

macrófagos de interleuquina -2 e INF γ y células citóxicas naturales activadas, la proliferación de células T CD4 $^{+}$ y la estimulación de linfocitos T citotóxicos. Las respuestas a la infección por este agente son de amplio espectro, incluyen células T colaboradores tanto 1 como 2 (Favoreel y col., 2006). Una de las consecuencias de la infección inducida por BoHV-1, es la depresión de la respuesta inmune mediada por células, lo cual está relacionado con una mayor susceptibilidad a las infecciones secundarias tanto virales como bacterianas (Hodgson y col., 2005)

Diagnóstico: Se puede realizar mediante la detección de la presencia de anticuerpos específicos en el suero de los animales. La serología positiva proporciona un indicador útil y confiable del estado de infección. Cualquier animal con anticuerpos contra el virus es considerado un portador y un potencial excretor intermitente, excepto en el caso de terneros jóvenes que adquieren de forma pasiva anticuerpos de la madre y el ganado que está sano y vacunado (Favoreel y col., 2000). Las técnicas de seroneutralización (SN) in vitro y varios Ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida son empleados usualmente para detectar anticuerpos contra BoHV-1 en suero (Manual de la OIE, 2004).

4.1.3 BVD (DIARREA VIRAL BOVINA)

La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico.

Etiología. El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Donis, 1995). Son virus envueltos, esféricos, compuesto de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella (Nettleton y Entrican, 1995). Según sus efectos en los cultivos celulares, los *Pestivirus* se dividen en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP ocasionan vacuolización citoplasmática y muerte celular, los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal (Deregt, 2005; Loewen, 1995). La genotipificación es el método aceptado para clasificar a los *Pestivirus*. Bajo este sistema de clasificación el vDVB se agrupa en 2 genotipos: Genotipo 1 y Genotipo 2 (Ridpath, 1996).

Situación en el país. En nuestro país, si bien la BVD fue sospechada clínicamente desde antes de la década del 80, recién en el año 1996, se comunicó su detección por técnicas inmunohistoquímicas e inmunoperoxidasa (Repiso y col., 2004). Diversos estudios serológicos, tanto en ganado de carne como de leche, han estimado la prevalencia de la infección en el país entre un 97 al 100% en establecimientos y entre un 60 a 72% a nivel individual (Saizar, 1998; Núñez y col., 2000; Gil y col., 2000). En el año 2016 Maya y col. publicaron la primera caracterización genética de vDVB en Uruguay con muestras de predios con problemas reproductivos colectadas en 2014, mostró que tanto vDVB-1 y vDVB-2 circulan en nuestros rodeos, y se observó una supremacía de vDVB-1a con un 87,5%.

Transmisión. Puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto. La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la

preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente (PI) (Moennig y Liess; 1995). Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. La transmisión horizontal ocurre por contacto directo con animales PI, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales (Houe, 1999). El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus (Houe, 1999).

La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI (Persistentemente Infectado). Ellos eliminan continuamente durante toda su vida grandes cantidades del virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuente de infección; aunque menos eficiente, ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos períodos (Houe, 1999).

Signos Clínicos. El vDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Bielefeldt, 1995). Diarrea viral bovina aguda, es una infección post natal aguda, de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes (Kelling, 1996). La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado con elevada morbilidad y baja mortalidad (Baker, 1987; Kelling, 1996). Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida (Fredriksen y col., 1999). Una de las formas de presentación de la infección aguda es el complejo diarrea neonatal bovina cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas (Moennig y Liess, 1995). Otra manifestación clínica es la infección aguda severa que cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita (Drake y col., 1996). El mayor impacto económico de la infección con el vDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos (Moennig y Liess, 1995). La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa necrosis de células de la granulosa y de oocitos (McGowan y col., 2003). Además, las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos (Grooms y col., 1998), reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular (Fray y col., 1999) y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre-ovulatoria (McGowan y col., 2003). El impacto del vDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos. Etapa embrionaria (0–45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune (McGowan y col., 2003). Día 45 a 125 de gestación: Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al vDVB.

La infección con biotipos NCP antes que el feto adquiriera competencia inmunológica, resulta en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis. Día 125 a 175 de gestación: Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de gestación. 175 días de gestación en adelante: En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales (Moennig, Liess, 1995). Un animal persistentemente infectado es aquél en que es posible aislar el virus de la sangre o tejidos en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les originó inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el laboratorio para su diagnóstico (Kelling, 1996). Enfermedad de las mucosas: Esta condición solo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos CP homólogos. En esta forma se aíslan ambos biotipos, que son antigénicamente similares. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo (Baker, 1987; Kelling, 1996).

Diagnóstico. Las pruebas serológicas han sido una buena herramienta para la detección de la presencia del virus en las poblaciones bovinas; entre ellas se destacan la Neutralización y Seroneutralización, las cuales detectan Anticuerpos neutralizantes contra virus que aparece en el suero de los animales post infección, siendo la SN in vitro la técnica de diagnóstico recomendada por la OIE (OIE, 2010), Se utiliza también el ELISA para diagnóstico serológico de infección por BVD (Albeláez y col., 2002) y la inmunofluorescencia indirecta IFI (Lértora, 2003). El análisis serológico de una pequeña muestra de sangre permite distinguir rebaños con infección activa, con un alto grado de seguridad, pero se pueden cometer errores de clasificación cuando los rebaños poseen animales PI. Una vez identificados los rebaños con infección activa, se debe testear individualmente a los animales para detectar a los bovinos PI, los cuales se diagnostican detectando el virus, o componentes virales. Para detectar el virus o componentes virales se pueden utilizar 4 métodos diferentes: Aislamiento viral el cual es 100% específico y muy sensible.

Detección de antígenos mediante enzimo–inmunoensayo (ELISA) es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI. Se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del vDVB en muestras de sangre. Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ). Detección del ácido nucleico viral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido, sensible, que detecta diversos vDVB y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo. (Lértora, 2003)

4.1.4 BoHV-4 (Herpesvirus bovino tipo 4)

El herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) ha sido aislado de bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis y de animales aparentemente sanos en diferentes partes del mundo. Se desconoce la situación epidemiológica en el país, ya que hasta el momento no existen reportes de estudios realizados en el territorio Uruguayo. Si bien no se ha reconocido como agente causal de una entidad patológica en particular, se asocia principalmente con infecciones del tracto reproductivo de los bovinos (Morán y col., 2015).

Etiología. El herpesvirus bovino tipo 4 pertenece a la familia *Herpesviridae*, Subfamilia *Gammaherpesvirinae*. Inicialmente considerado como un citomegalovirus, fue clasificado luego dentro del género *Rhadinovirus* dada la actividad de la timidina quinasa y las semejanzas genómicas con otros virus de este subgrupo (Lomonte, y col., 1996). Los gammaherpesvirus se caracterizan por su capacidad de replicar en células linfoides, donde pueden establecer latencia (Donofrio y col., 2005). Los diferentes miembros de la familia pueden infectar específicamente a los linfocitos T o B. El genoma del BoHV-4 consiste en una molécula de ADN lineal bicatenario (Zimmermann y col., 2001). El material genético se encuentra contenido en una cápside de simetría icosaédrica. La nucleocápside viral tiene un diámetro de 90 a 100 nm y se encuentra rodeada por una sustancia amorfa denominada tegumento. Estas estructuras están cubiertas por una bicapa lipídica que presenta proyecciones glucoproteicas sobre la superficie del virión (Knowles, 2011).

Transmisión. Los herpesvirus pueden transmitirse por vía horizontal y vertical (Egyed, 2011). La transmisión horizontal ocurre por contacto directo e indirecto mediante secreciones y fómites.

En el caso particular del BoHV-4, la respuesta inmune se caracteriza por la escasa producción de anticuerpos neutralizantes; estos bajos niveles de anticuerpos en la leche y en el calostro de vacas infectadas podrían favorecer la transmisión del virus a los terneros en lactancia, la leche representaría un potencial vehículo para la transmisión y diseminación viral (Donofrio, 2000). Se detecta una mayor frecuencia de seropositivos en los animales de mayor edad y en hembras con respecto a los machos (Elhassan y col., 2011). El BoHV-4 puede producir diferentes tipos de infecciones, es así que pueden identificarse diferentes dinámicas de infección: la infección no productiva, la infección productiva, la infección persistente, y la infección latente. Aunque se ha demostrado que puede infectar una variedad de tejidos, la mayoría de las evidencias sugieren que uno de los sitios de persistencia, son las células de la línea monocitos/macrófagos (Egyed, 2011)

Signos Clínicos. Diversos estudios han asociado al BoHV-4 con enfermedad uterina posparto en bovinos (Sheldon y col., 2009). El virus presenta tropismo por las células endometriales y produce la muerte de células epiteliales y del estroma (Donofrio y col., 2007). La infección por el BoHV-4 estimula la secreción de la prostaglandina E (PGE) en las células endometriales; la PGE es un mediador de la respuesta inflamatoria en infecciones bacterianas y desempeña una función importante en la reactivación seguida de replicación lítica del BoHV-4. La asociación de este virus con otros patógenos en los casos de metritis ha sido demostrada, por lo tanto, la metritis bacteriana en el ganado persistentemente infectado con el BoHV-4 podría ser exacerbada por el reclutamiento de macrófagos persistentemente

infectados al sitio de la inflamación (Donofrio y col., 2008). A su vez, la endometritis bacteriana conduciría a la secreción de PGE y consecuentemente, a la estimulación de la replicación viral por prostaglandina E (PGE) y lipopolisacáridos (LPS), lo cual causaría el posterior daño en el tejido endometrial y la inflamación (Sheldon y col., 2009). La manifestación de los trastornos en el endometrio asociados a BoHV-4 involucraría tres factores: la exposición al virus, la colonización bacteriana del útero a través del cérvix abierto y la existencia de algún grado de disturbio metabólico o inmunosupresión; estos conducirían al desarrollo de la patogenicidad viral o reactivación desde el estado de latencia. El ganado lechero con infección endémica por BoHV-4 y con una alta incidencia de enfermedades metabólicas o nutricionales crónicas probablemente presente mayor incidencia de metritis y piometra asociados al virus (Frazier y col., 2002). El BoHV-4 ha sido aislado en una amplia variedad de casos clínicos. Si bien no se ha reconocido como agente causal de una entidad patológica específica, se asocia mayormente con infecciones del tracto reproductivo de los bovinos, particularmente durante el período posparto. Dentro de la amplia variedad de signos clínicos se puede observar conjuntivitis, enfermedad respiratoria, vaginitis, metritis, linfosarcoma, dermatitis, endometritis supurativa posparto y mastitis.

Respuesta inmune. La respuesta inmune humoral en los bovinos infectados con BoHV-4 se caracteriza por baja eficiencia o bajos niveles de anticuerpos neutralizantes (Dubuisson y col.; 1990). Los países donde el virus se ha detectado, la prevalencia en general es baja, con bajos títulos de anticuerpos neutralizantes (1:8 a 1:64) (Asano y col., 2003). En infecciones experimentales realizadas en bovinos se detectaron altos niveles de serología positiva por ELISA; sin embargo, los resultados fueron negativos en la detección de anticuerpos neutralizantes mediante pruebas de neutralización viral (Essmail y col., 1999).

Diagnóstico. El aislamiento viral puede realizarse en cultivos celulares y es el método gold standard (Naeem y col., 1991). Puede utilizarse la Inmunofluorescencia directa, para la detección de antígeno viral, así como la PCR, técnica molecular muy utilizada para amplificar diferentes regiones del genoma viral (Lomonte, 1997). Para el diagnóstico serológico, el método más utilizado es la prueba de ELISA, y en algunos casos la IF indirecta (Kale y col., 2011). La Seroneutralización puede dar un alto número de falsos negativos, y por lo tanto sería aconsejable utilizar otras técnicas serológicas alternativas para el diagnóstico de laboratorio (Dubuisson y col., 1990).

4.1.5 LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta a los mamíferos tanto domésticos como silvestres, se considera que es una de las enfermedades zoonóticas de mayor diseminación a nivel mundial (Thiermann, 1984).

Etiología. El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae* (Canale y Parola, 1984). En cuanto al criterio de clasificación para el género *Leptospira* la especie de interés es *Leptospira interrogans*, que incluye todas las leptospirosis patógenas y/o de vida parásita. Estas cepas patógenas se clasifican sobre la base de sus diferencias antigénicas en serovares, siendo el serovar el taxón básico. Los serovares relacionados antigénicamente se integran dentro de un mismo serogrupo (Laguna, 2005). En todo el mundo se han descrito más de 220 serovares pero,

frecuentemente, las infecciones se producen por un número limitado de serovares endémicos de una región o país y su prevalencia está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales (Ayulo y Dammert, 2001). En el Laboratorio de DILAVE se reciben anualmente aproximadamente 4.000 muestras de sueros, de las que se corresponden 3.500 a bovinos por consulta de abortos e infertilidad. De los sueros de bovinos estudiados el 80% presentan anticuerpos a leptospira, de los serovares *L. Hardjo* y *L. Pomona*, siendo la situación similar a los demás países de la región (DILAVE, 2004).

Transmisión. El modo más frecuente de transmisión en el caso de serovares adaptados es la transmisión horizontal directa, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado con material infectante (Ellis, 2001). La transmisión por contacto directo puede producirse de diversas maneras, siendo una de las más importantes la entrada de leptospiras por vía inhalatoria o conjuntiva, procedente por la dispersión de orina de animales infectados. Los hospedadores naturales de un determinado serovar, eliminan gran cantidad de microorganismo en su orina durante un período de tiempo prolongado (Ellis, 2001).

La transmisión indirecta juega un papel más destacado en el caso de infecciones por serovares accidentales. La forma de transmisión más frecuente, tanto en el hombre, como en los animales, es el contacto de la piel o mucosas con agua o materiales contaminados con orina infectada. Por lo tanto, las fuentes de contaminación más frecuentes para los bovinos van a ser la orina (Michna, 2004), la leche (Prescott, 2000), las descargas post parto (Ellis, 2001; Timoney y col., 2005) y el agua y pastos contaminados con estos materiales procedentes de animales infectados.

Signos Clínicos. La presentación de la enfermedad puede ser aguda, sub-aguda o crónica. Después de penetrar por piel o mucosas el microorganismo tiene un periodo de incubación de 4 a 10 días, en el cual se multiplica rápidamente y se disemina en ciertos órganos: hígado, riñón, pulmones, tracto reproductivo (como en el caso de la placenta), y líquido cefalorraquídeo; después migra y puede aislarse en la sangre periférica durante varios días, hasta que cesa la fiebre (Bermúdez, 2006). Después pueden observarse anticuerpos en el torrente sanguíneo, y puede aislarse la bacteria de la orina. La manifestación clínica más dramática en los bovinos es la aparición de abortos, lo cual determina el motivo de consulta de los productores a los profesionales (Bermúdez, 2006).

Diagnóstico. Los métodos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad son aislamiento o identificación serológica. La técnica de diagnóstico que se utiliza en el servicio de leptospirosis de DILAVE, es la microaglutinación, que se indica con la sigla MAT. Esta técnica es utilizada en todo el mundo como de referencia, es serovar específica e indica el nivel de anticuerpos. Los serovares más comunes en los bovinos de Uruguay son hardjo, wolffi, y pomona (Repiso y col., 2005). En nuestro país, que se considera endémico, el título de corte utilizado para clasificar a los bovinos como positivos es de mayor o igual a 1/200 (DILAVE). En este caso, para evidenciar una exposición previa al patógeno en bovinos no vacunados, es necesario determinar títulos iguales o superiores a 1:100 (OIE, 2008).

4.1.6 BRUCELOSIS

La brucelosis es una enfermedad bajo campaña sanitaria oficial que cursa principalmente con abortos sobre todo en el último tercio de la gestación. La Brucelosis causa graves pérdidas económicas a la salud pública y a la producción animal por abortos, esterilidad, merma de la producción lechera, gastos veterinarios, reposición de los animales y pérdidas de mercados nacionales e internacionales (Samartino, 2000; Gil y col., 2003;).

Etiología. La *Brucella* perteneciente a la familia *Brucellaceae* es una bacteria intracelular facultativa con predilección por el sistema retículo-endotelial; y el tracto y órganos reproductivos (Nicoletti, 2002). Generalmente la diseminación de la enfermedad ocurre por una hembra infectada que al parir o abortar disemina gran número de Brucellas. La leche es también fuente de contagio aunque una vez pasteurizada el riesgo desaparece.

Transmisión. La fuente principal de infección son los fetos, envolturas fetales y descargas vaginales. En partos de vacas infectadas que no abortan se eliminan gran cantidad de Brucellas. Los terneros nacidos de hembras positivas pueden quedar con una infección congénita latente lo que tiene gran importancia epidemiológica. El animal contrae la enfermedad por ingestión, penetración por conjuntiva y piel indemne. El contacto con fetos abortados es la forma más común de propagación (Acha y Cifres, 1989). En Latinoamérica la enfermedad está presente en todos los países, algunos como México y Perú con prevalencias muy altas y otros como Uruguay cuya prevalencia es baja pero aún se manifiestan brotes aislados (Barozzi, 1993; Gil y col., 1999; Gil y col., 2003). Uruguay inició un Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Bovina a partir del año 1998, luego de varias medidas tomadas con sus aciertos y fracasos, en el control y erradicación de la enfermedad, se destacan las siguientes medidas: monitoreo mediante la exigencia de resultados serológicos negativos para el ingreso a las exposiciones, remates ferias, liquidaciones y exportaciones. Interdicción con obligatoriedad de serología negativa previa al movimiento de los ganados susceptibles comprendidos en las zonas categorizadas como de riesgo en relación a la brucelosis bovina, incluyendo el predio declarado foco, los linderos, y los tras linderos al foco. Vacunación con RB51, en predios focos y perifocos; y la obligatoriedad de realizar serología en todos los establecimientos lecheros para la refrendación anual. Vigilancia en los establecimientos lecheros se realizan a través de ELISA sobre las muestras compuestas de leche extraídas de los tanques. (MGAP, 2017)

Signos Clínicos. El signo predominante en hembras preñadas es el aborto en los tres últimos meses de gestación o el nacimiento prematuro o a término de terneros débiles o muertos. Se presenta además retención de placenta, metritis e infertilidad en vacas, dejando como secuela un aumento del intervalo inter parto. Las hembras no preñadas no muestran signos clínicos y cuando se infectan antes del servicio muchas veces no abortan (Repiso y col., 2005).

Diagnóstico. El diagnóstico presuntivo o serológico se realiza mediante la técnica de Rosa Bengala. El diagnóstico confirmatorio por fijación del complemento y polarización de la fluoresceína o por aislamiento del microorganismo en medios específicos. Las pruebas serológicas normalizadas y efectuadas con reactivos estandarizados constituyen un elemento clave en los programas sanitarios y en la vigilancia epidemiológica (Casas Olascoaga, 1976; Chans, 2003). Las mismas

pueden ser clasificadas como: presuntivas, confirmatorias y de vigilancia epidemiológica. Como presuntivas las más utilizadas son: la prueba de Rosa de Bengala (Antígeno tamponado a pH 3.65 con contenido celular del 8%). Como confirmatorias, pueden utilizarse las pruebas de: Rivanol, 2 Mercapto-etanol (2ME), Fijación del complemento y polarización de la fluoresceína. Estas pruebas están indicadas para procesar los sueros positivos a las técnicas presuntivas o de descarte y disminuir así los resultados falsos positivos, que ocurren mayoritariamente en regiones de baja prevalencia o donde se practica la vacunación sistemática (Casas Olascoaga, 1976). Es de destacar que las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISAS) son excelentes herramientas a utilizar en programas de control ya que presentan excelente sensibilidad y especificidad (Nielsen y col., 1992). El DILAVE ha participado en estudios de validación de las mismas (Uzal y col., 1995; Silva Paravis y col., 1998;).

4.1.7 CLAMIDIOSIS

La clamidiosis es una enfermedad de distribución mundial (Albarracín, 2010). Afecta a una amplia gama de especies, tanto aviares como mamíferos, en donde se incluye al hombre (Salinas, 2002).

Etiología. Las clamidias son bacterias Gram negativas, intracelulares obligadas, con un ciclo de desarrollo atípico, durante el cual se desarrollan formas únicas. Se replican en el interior de las vacuolas citoplasmáticas de las células del hospedador. Su incapacidad para generar ATP determina su dependencia del metabolismo de las células hospedadoras (Quinn y col., 2008). El agente etiológico pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, esta familia pertenece al orden de los Clamidiales. La familia *Chlamydiaceae* se ha descrito en 2 géneros, *Chlamydia* y *Chlamidophila*, los cuales tienen nueve especies en total. Entre las especies que afectan en mayor medida al ganado vacuno están la *Chlamidophila abortus* y *Chlamidophila pecorum*. Las cepas de *C. abortus* son tipos de cepas de la *C. psittaci* abortiva biotipo 1 inmunotipo 1, las clamidias producen varias patologías en el ganado bovino como encefalomiелitis, conjuntivitis, abortos, etc. Los serotipos de clamidias que producen aborto en vacas y ovejas son diferentes a los serotipos que producen encefalomiелitis y poliartritis (biotipo 2/ inmunotipo 2) y a su vez diferentes a los que producen infecciones intestinales (biotipo 3/ inmunotipo 3). Las cepas que producirían infecciones intestinales han sido reclasificadas como *Chlamydia pecorum* (Stanchi y col., 2007).

Transmisión. El ciclo de reproducción del microorganismo puede durar de 24 a 48 horas. Los estudios sobre el ciclo de crecimiento de *C. trachomatis* y *C. psittaci* en cultivos celulares in vitro revelan que el cuerpo elemental infeccioso (EB) se convierte en un cuerpo reticulado no infeccioso (RB) dentro de una vacuola citoplasmática en la célula infectada. Una vez que se han replicado los RB estos van a ser liberados al exterior produciendo la lisis de la célula invadida (Bolaños y col., 2008). Las clamidias que salen al medio ambiente a través de las heces de los animales afectados, pueden sobrevivir varios meses en las heces secas de los animales (Perez y Storz, 1987). Después que estas salen al exterior las mismas pueden ser ingeridas por animales sanos produciéndose una nueva infección. No sólo las heces son fuentes de infección, también forman parte de la diseminación, la orina, secreciones respiratorias, líquido amniótico y placenta de animales sintomáticos o asintomáticos, como también la saliva o plumas de aves (Pospischil y col., 2010). Asimismo, los abortos de los animales afectados y el semen de machos

que presentan la enfermedad (Albarracin, 2010). El organismo fue encontrado en el semen de los toros, carneros, pero la transmisión venérea no es de gran importancia (Pospischil y col., 2010)

Signos Clínicos. Los signos clínicos abarcan flujo nasal que puede ser seroso mucoso, se puede presentar sialorrea, lagrimeo, tos, inapetencia, en terneros de corta edad se puede presentar diarrea (Dirksen y col., 2005). Por otro lado se pueden observar descargas a nivel de la vulva, y si se toma la temperatura corporal el animal puede presentar fiebre hasta 48 horas antes de que el aborto se produzca y las descargas vulvares pueden permanecer hasta 2 a 3 semanas lo que aumentaría la probabilidad de contagio de animales sanos. Si el contagio se produce dentro de las 5 a 6 semanas de la preñez, la infección puede mantenerse latente, y las manifestaciones clínicas se presentaran en el siguiente parto (Diaz y col., 2005). El aborto de los animales preñados se produce generalmente a nivel de las últimas semanas de la gestación, si este no se produce se da el nacimiento de animales prematuros y débiles. Los animales abortados no manifiestan síntomas clínicos de la enfermedad, pero la fertilidad se reduce (Quinn y col., 2008). En los bovinos los abortos, tienden a ser esporádicos e inesperados, se dice que el animal suele abortar a nivel del séptimo a noveno mes de la gestación es decir, en el tercer tercio, antes de que los animales aborten no se presentan signos clínicos que evidencien la presencia de la enfermedad. Además del aborto se producen otros trastornos reproductivos que hacen que el animal repita celos, presente intervalos entre partos prolongados, que el número de servicios a realizar sea mayor, todos estos trastornos van en desmedro de la economía de una explotación, sin tomar en cuenta la baja de la producción de los animales enfermos así como también la disminución de la fertilidad del semen de los toros afectados (Gibson da Silva y col., 2005).

Diagnóstico. Las muestras ideales son hisopados nasales, oculares y rectales. También se pueden enviar muestras de heces, orina, saliva y órganos, como cerebro o médula espinal, placenta, cotiledones, linfonódulos, articulaciones, exudados, hígado, epidídimo, vesículas seminales así como también muestras del feto. Por último también se pueden realizar muestras pareadas de sangre. Cuando la bacteria se encuentra en un período de latencia no puede ser detectada por los métodos de laboratorio utilizados comúnmente (Albarracin, 2010). La reacción de fijación del complemento, con un antígeno específico pone de manifiesto los anticuerpos. También, se utilizan las técnicas de ELISA (Nicolet, 1985), IFI, para detección de anticuerpos, y PCR (Soto, 2001). Inmunoensayos dirigidos contra el LPS se han desarrollado para detectar clamidias; sin embargo, son generalmente *Chlamydiaceae* específicos y no permite la identificación de la especie, serotipo, o subtipo involucrado (Pospischil y col., 2010). Se puede utilizar el microscopio para la detección de las inclusiones intracitoplasmáticas en las células afectadas, a las que se le harán cortes y tinción (Albarracin, 2010). Las tinciones pueden ser de Giemsa, Ziehl-Nielsen (Nicolet, 1985), como también Lugol, y por las técnicas de IFD y ELISA para la detección de antígenos (Soto, 2001). Como métodos de aislamiento, el más sensible consiste en la inoculación en embriones de pollo (saco vitelino) (Nicolet, 1985; Soto, 2001) aunque también se realizan cultivos celulares en células McCoy (Soto 2001).

4.1.8 NEOSPOROSIS

La Neosporosis es una de las principales causas de aborto bovino en varios países y produce severa afección neuromuscular en perros. Fue reportada por primera vez en Noruega (Bjerkås y col., 1984) en caninos.

Etiología. Esta enfermedad es causada por *Neospora caninum*, protozooario (Apicomplexa, Sarcocystidae) similar a *Toxoplasma gondii* pero inmunológicamente diferente, descrito por Dubey en 1988. En 1989 Thilsted y Dubey describen la *N. caninum* como agente causal de aborto bovino en USA. Es de difusión mundial y se la ha reportado como causante de importantes pérdidas por aborto en bovinos en USA, Gran Bretaña, Nueva Zelanda, Australia, Japón y Argentina (Anderson 1991; Dubey, 1999).

Situación en el país. El primer antecedente que se tiene sobre la posible presencia de esta enfermedad en nuestro país se remonta a 1997, cuando se describe que el 20% de 414 perros de estancia de nuestro país eran positivos a la técnica de IFI para *N. caninum* (Barber y col., 1997). En 1999 la DILAVE comunica los primeros diagnósticos de esta enfermedad, tanto en caninos como en bovinos, realizados por medio de técnicas de inmunohistoquímica y serológicas (IFI y ELISA), siendo diagnosticada en forma rutinaria a partir de esa fecha (Bañales y col., 2000).

Transmisión. Las especies afectadas son varias, estando descrita la infección natural en caninos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y cérvidos, así como la infección experimental en ratas, ratones, perros, zorros, cabras, gatos, ovejas, coyotes, cerdos, conejos, bovinos y primates. Hasta el momento no hay ningún reporte de infección en seres humanos (Tranasy col., 1998). Uno de los huéspedes definitivos es el perro (McAllister y col., 1998; Lindsay y col., 1999), siendo a la vez huésped intermediario. Como huésped definitivo elimina en sus heces ooquistes que son ingeridos por los huéspedes intermediarios. En las diferentes especies, una vez ingresado el agente a una determinada población, la principal vía de propagación y mantenimiento de la infección es la transplacentaria, no existiendo la transmisión entre adultos. Una vez que un bovino se infecta al ingerir pasturas o raciones contaminadas, el mismo quedará muy probablemente infectado de por vida, sin sufrir sintomatología alguna, pero podrá transmitir la infección por vía transplacentaria a sus sucesivas crías. No existen reportes hasta el momento de transmisión por semen o embriones.

Signos clínicos. En los bovinos adultos, al igual que en otras especies afectadas, predomina la infección congénita asintomática. Puede producir aborto, momificación y muy raramente signos neurológicos en neonatos. Los abortos se producen con mayor frecuencia entre los 4 y 6 meses de gestación, siendo frecuente la autólisis en el feto. El aborto puede darse en porcentajes variables de acuerdo a la situación epidemiológica del rodeo. Se ha observado la presentación de la enfermedad en forma aislada, esporádica o epidémica. Un estudio confirmó a *N. caninum* como causante del aborto en el 37 % de los fetos bovinos remitidos a la DILAVE durante el período 1999/2000 (Easton y col., 2001). En un rodeo previamente indemne la infección puede producir un alto porcentaje de abortos en un corto período de tiempo, mientras que en rodeos con una infección de cierto tiempo la presentación de los abortos se mantendrá en niveles más bajos. Una vaca puede abortar en sucesivas preñeces, así como dar nacimiento a terneros asintomáticos,

congénitamente infectados y con serología positiva, difundiendo así la infección dentro del rodeo.

Diagnóstico. La infección por *N. caninum* puede demostrarse mediante la utilización de pruebas inmunodiagnósticas, por técnicas histopatológicas, moleculares y de aislamiento (Dubey, 2003). Las pruebas inmunodiagnósticas disponibles son la IFI, ELISA, aglutinación directa, inmunohistoquímica (IHQ) y electroforesis combinada con inmunodetección (Western Immunoblot) (Dubey, 1999). La histopatología y la IHQ realizadas en tejidos bovinos fetales son técnicas diagnósticas relevantes en las infecciones por *N. caninum* (Anderson, 2000). El diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* puede emitirse ante la presencia de lesiones como meningoencefalitis necrotizante multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares (Anderson, 2000). La presencia del parásito en dichas lesiones puede confirmarse mediante IHQ realizada sobre tejidos fetales formolados (Anderson, 2000). Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (Anderson, 2000).

Por otro lado, el impacto de la técnica de PCR ha sido notable, permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos (Dubey, 2003). Debido a la alta eficiencia que tiene *N. caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por IHQ o PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y utilización de otras técnicas diagnósticas, no sólo para identificar dicho protozoo sino también para descartar otras causas de aborto. El aislamiento de *N. caninum* es difícil y costoso como técnica diagnóstica (Conrad y col., 1993), sin embargo se han logrado aislamientos en regiones ganaderas de todo el mundo (Dubey, 2003).

4.2 IMPORTANCIA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA

La LBE es una enfermedad de distribución mundial con particular predilección por sistemas productivos lácteos intensivos. Desde el punto de vista sanitario y económico la LBE tiene un impacto significativo económico por los costos en diagnóstico, descarte de animales, disminución de los índices productivos, impacto en índices reproductivos, tratamientos de patologías concomitantes, disfunción del sistema inmune, así como algunas investigaciones proponen una relevancia en la salud pública por la posible infección al humano (Baruta, 2011).

Las pérdidas económicas causadas por la LBE han sido de interés desde que la forma neoplásica de VLB aumentó dramáticamente en Europa. Olson (1974) y House y col., (1975) demostraron que los animales con Linfosarcoma causada por el VLB habían reducido los rendimientos de leche, habían tenido un rendimiento reproductivo menos eficiente y altos costos veterinarios sumándole la mortalidad, mientras que muchas carcasas son rechazadas en el sacrificio. Estudios realizados sobre animales positivos a VLB pero sin Linfosarcoma demostraron que el rendimiento de leche fue un 11% menor en animales seropositivos (D'Angelo y col., 1997), pero en cuanto a los parámetros reproductivos, existen controversias en los antecedentes existentes sobre este tema. Diferentes ensayos revelan que los mismos no se vieron afectados directamente por VLB (Langston y col., 1978; Huber y col., 1981; Brenner y col., 1989; D'Angelo y col., 1997). Aunque Junwook Chi y col.

en 2002 obtuvieron en Canadá que vacas seropositivas a VLB, tienen una tendencia a la asociación negativa con intervalo interparto (IIP) comparado con vacas seronegativas a VLB ($p=0,06$) y un alto riesgo de IIP prolongado en vacas de primera lactación. Otros ensayos realizados en sistemas de producción de leche, encontraron que vacas infectadas con VLB, requerían más servicios por concepción (García y col., 2000). VanLeeuwen y col. en 2010, demostraron en ganado lechero de diferentes estados de Canadá, que la seropositividad al VLB, está ligeramente asociado a IIP prolongado ($p=0,06$); y un alto riesgo de IIP prolongado en vacas de primera lactación. También que las vacas positivas a VLB tienen una tasa del 7 % inferior de concepción, comparado con vacas seronegativas. También Puentes y col. en 2016, obtuvieron una tasa del 27% menos de concepción en las vaquillonas holando seropositivas, durante un periodo determinado (Noviembre - Diciembre); pero no así en el otro periodo reproductivo (Junio - Julio).

Considerando la alta tasa de seroprevalencia encontrada en el ganado lechero del territorio uruguayo y los diferentes hallazgos (algunos contradictorios) acerca del impacto que la infección por VLB pueda tener sobre los parámetros reproductivos del ganado, son necesarias más investigaciones a campo y con técnicas más sofisticadas de diagnóstico, para comprender el real impacto de este virus en los sistemas productivos de nuestro país y estudios como el Bartlett y col., 2013, que demuestran que vacas seropositivas a VLB morían o eran descartadas primero que sus compañeras negativas a VLB dentro del rebaño, con las pérdidas que conlleva tanto desde el punto de vista de la producción que se pierde y la inversión en la recría o compra de los remplazos.

Sobre estos antecedentes, el presente ensayo pretende aportar conocimiento fundamentalmente sobre las posibles asociaciones entre VLB y la infección natural contra enfermedades de la reproducción (BoHV-1, BVD, BoHV-4, Leptospirosis, Neosporosis, Clamydiosis y Brucelosis) las cuales tendrían un impacto directo en la reproducción.

4.3 VLB Y LA RESPUESTA INMUNE

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

La respuesta humoral es la primera en participar luego de la infección. Anticuerpos contra varias proteínas virales pueden detectarse dentro de días o semanas después de exponerse al virus (Bumy y col., 1980). Se sintetizan anticuerpos que reconocen los epítopes estructurales (gp51 y p24) y proteínas regulatorias (Tax y Rex) (Florins y col., 2007). Del punto de vista inmunológico, la enfermedad por VLB se puede dividir en tres estadios: serológicamente positivo pero negativo a linfocitosis, serológicamente positivo con linfocitosis persistente (LP), y linfosarcoma (Kabeya y col., 2001).

Los animales seropositivos a VLB en fases tempranas de la infección, desarrollan una respuesta celular a predominio de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), con

producción de interferón gamma. En fases más crónicas con presencia de linfocitosis persistente (LP), se produce una respuesta Th2. Las alteraciones en la expresión de citoquinas mostraron estar correlacionadas con la progresión de la enfermedad en infecciones crónicas por retrovirus, sugiriendo que el balance de las citoquinas puede contribuir a la progresión de la enfermedad (Frie y col., 2016). Pyeon y col. (1996) examinaron los perfiles en células mononucleares de bovinos de cada estadio de la enfermedad y demostraron que la producción de citoquinas Th1 como IL2, IFN γ y IL12, eran promovidas en animales serológicamente positivos más que en aquellos con LP. Estas citoquinas actúan en forma temprana en los animales seropositivos y disminuyen con la progresión de la enfermedad (Yakobson y col., 1998). Se cree que IL2 juega un rol en la progresión de la enfermedad, provocando la proliferación de linfocitos B, contribuyendo a la LP inducida por el virus (Trueblood y col., 1998). Sin embargo, el aumento en la expresión de citoquinas Th2 como IL10, se detectó en etapas más avanzadas de la enfermedad (Pyeon y col., 1996). Además, se observó que la IL-10 está expresada principalmente por monocitos / macrófagos, no por linfocitos B, en animales LP. Esta observación apoya un papel de los monocitos / macrófagos en la progresión de la infección por el VLB. Estos hallazgos sugieren que la IL-10 producida por monocitos / macrófagos puede influir en la progresión de la leucosis bovina en animales que desarrollan linfocitosis persistente de células B o linfoma de células B (Pyeon y col., 1996).

La susceptibilidad a la expansión clonal de los linfocitos B infectados por el virus está asociada con alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (Nagaoka y col., 1999).

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

Se ha demostrado que la infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune que impacta directamente en la sanidad (Bartlett y col., 2014), como por ejemplo disminución de la función de los polimorfonucleares in vitro inducido por *Escherichia coli* (*E. coli*) en vacas infectadas (Souza y col., 2012). 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. Erskine y col., (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) comparando con vacas no infectadas. Otros ensayos, como en el de Puentes y col. (2016b) demostraron que las vaquillonas seropositivos a VLB, vacunadas contra Fiebre Aftosa, produjeron menor cantidad de IgM e IgG1 a los 15 días post-vacunación que los animales seronegativos. Frie y col., (2017) demostraron que la inmunidad de las células B y T están alteradas en las vacas VLB+ y que luego de la exposición a un determinando antígeno, la respuesta inmune es deficiente.

Por lo tanto, la LBE tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico. La alteración del sistema inmune provocado por la infección viral puede aumentar la incidencia de otras patologías afectando a la producción de leche, originando pérdidas directas por mortandad (Trainin y Brenner, 2005).

5. Hipótesis

5.1 Los animales infectados con el virus de la Leucosis bovina enzoótica poseen mayor probabilidad de haber estado expuesto a otros patógenos de interés reproductivo.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Analizar la asociación entre animales seropositivos a Leucosis bovina enzoótica (VLB) y la respuesta inmune humoral natural contra Diarrea Viral Bovina (BVD), Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1), Herpes Virus Bovino tipo 4 (BoHV-4), Clamidiosis, Leptospirosis, Brucelosis y Neosporosis.

6.2 Objetivos Específicos

Determinar la prevalencia y cuantificar los títulos de anticuerpos contra VLB en bovinos lecheros provenientes de diferentes establecimientos de Tacuarembó, Florida y Durazno.

Detectar y cuantificar los títulos de anticuerpos contra BVD y BoHV-1 mediante Seroneutralización (SN) *in vitro*.

Detectar y cuantificar los títulos de anticuerpos contra BoHV-4 mediante ELISA indirecto.

Detectar y cuantificar los títulos de anticuerpos contra Clamidiosis y Neosporosis mediante ELISA indirecto.

Detectar y cuantificar los títulos de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovares: *Ballum*, *Bratislava*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Hardjobovis*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Tarassovi* y *Wolfi* mediante la prueba de Microaglutinación en placa (MAT).

Detectar anticuerpos contra Brucelosis mediante aglutinación en placa (Rosa de Bengala).

Evaluar posibles asociaciones existentes entre la seropositividad a VLB y el status sanitario contra las enfermedades reproductivas analizadas.

7. Materiales y métodos

Muestra de los animales:

Se utilizaron 655 muestras de un banco de suero de ganado lechero del año 2009 sin antecedentes de vacunación contra enfermedades reproductivas existente en el

Departamento de Ciencias Microbiológicas proveniente de los Departamentos de Tacuarembó, Florida y Durazno. Se utilizaron las muestras conservadas a -20 °C y los registros existentes correspondiente al Departamento, localidad y productor.

ELISA para la detección de anticuerpos contra VLB (Laboratorio VMRD, WA, USA)

Para el diagnóstico de VLB se empleó la detección de anticuerpos anti gp51 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Se utilizó un kit comercial para detectar anticuerpos contra VLB en suero bovino con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA, aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura se realizó a 620 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Seroneutralización (SN) *in vitro* para BoHV-1 y BVD

Los anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 (agente de IBR) y BVD se evaluaron mediante la técnica de SN *in vitro* recomendada por la OIE (OIE, 2008). Brevemente, 50 µl de cada suero se mezclaron con 50 µl de 100 TCID₅₀ (50% dosis infectante de cultivo 50) de virus. Luego de 24hs de incubación a 37 °C, 100 µl de una suspensión celular de MDBK (3 x 10⁴ células) se agregó por pocillo y las placas fueron incubadas en estufa a 37 °C con 5% de CO₂ durante 5 días, observando la presencia de efecto citopático diariamente. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó mediante el método de Reed & Muench (1938).

ELISA para la detección de anticuerpos contra Herpes Virus Bovino tipo 4

Se utilizó el kit de ELISA comercial para BoHV-4 disponibles en plaza para cuantificación de anticuerpos en suero bovino (Bio-X Diagnostics). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en una dilución final 1:100, y las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 450nm.

ELISA para la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* y *Neospora caninum*

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 e IDEXX Chlamydiosis Total Ab Test Referencia: CLA1135T). En ambos casos las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y las lecturas en el espectrofotómetro se realizaron a una longitud de onda de 450 nm.

Rosa de bengala

Para el diagnóstico de Brucelosis bovina, se empleó la técnica de aglutinación en placa Rosa de Bengala. Se utilizó un kit comercial gentilmente cedido por el Laboratorio Virbac-Santa Elena. Se colocaron 30 µl de cada suero problema y enfrentado a 30 µl de reactivo rosa bengala, se mezclaron y luego de 4 minutos en agitación se evaluó la reacción. El fenómeno de aglutinación puede ser observado luego de 4 minutos de incubación a temperatura ambiente y agitación unidireccional. La prueba se consideró positiva frente a la presencia de grumos, de cualquier

intensidad. El resultado fue negativo cuando no se evidenció ninguna aglutinación, permaneciendo homogéneo la mezcla.

Test de aglutinación microscópica (MAT) para cuantificación de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* spp.

Para el diagnóstico de Leptospirosis, se utilizó el MAT, que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes en suero bovino. 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 utilizó 12 serovars de *Leptospira interrogans* de importancia para los bovinos (*Ballum*, *Bratislava*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Hardjobovis*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Tarassovi*, *Wolffi*) y se realizó la técnica en las instalaciones del laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina – Universidad de la Republica, siguiendo los procedimientos estándar descritos por la OIE. El título de corte utilizado para clasificar a los bovinos como positivos fue de mayor o igual a 1/200 (recomendados por el DILAVE - MGAP). En este caso, para evidenciar una exposición previa al patógeno en bovinos no vacunados; en este caso, para evidenciar una exposición al patógeno en bovinos no vacunados, se empleó un título de corte iguales o superiores a 1:100 como lo recomienda la OIE (OIE, 2008).

Elaboración de registros y análisis estadísticos

Mediante el empleo de Microsoft office Excel se elaboraron planillas donde se identificó a cada animal con un número, edad, el departamento de procedencia, establecimiento y los resultados para cada enfermedad expresados como positivos o negativos. Para el análisis estadístico se realizó un estudio descriptivo de los resultados, y se aplicó la Prueba de Chi cuadrado entre cada enfermedad reproductiva estudiada y la infección con VLB.

8. Resultados

Se determinó la presencia de anticuerpos contra VLB en los tres departamentos en los cuales se tomaron muestras (Durazno, Florida y Tacuarembó), con una seroprevalencia total de 20% (131/655). La seroprevalencia por departamento fue de 20,23%, 22,06% y 19,38% respectivamente (Figura 1). De las 655 muestras, 332 pertenecieron a 29 diferentes establecimientos, de los cuales en 21 hubo por lo menos un animal con títulos de anticuerpos altos contra VLB; mientras tantos en los 8 establecimientos restantes no se detectaron animales seropositivos contra VLB. El establecimiento con mayor prevalencia se ubicó en Durazno, con un valor de 36,36%.

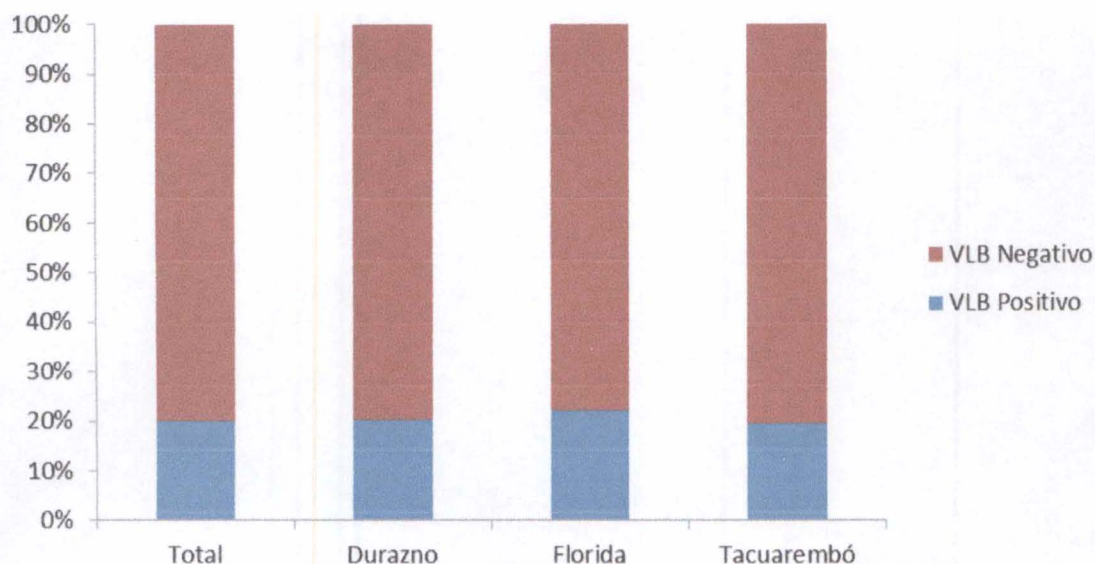


Figura 1. Seroprevalencia al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica, total y clasificada por departamento en estudio.

Con respecto a los resultados de Diarrea Viral Bovina, el 99,39% (651/655) de los animales presentaron anticuerpos, que se diagnosticaron por Seroneutralización *in vitro*. Mediante esta misma técnica, se diagnosticaron títulos de anticuerpos contra BoHV-1, donde se obtuvo una prevalencia total de 41,19%; separados por departamento la prevalencia fueron de 23,53%, 41,67%, y 53,63% para los departamentos de Florida, Durazno, y Tacuarembó respectivamente. En cuanto a los establecimientos estudiados, solo 2 de los 29 resultaron seronegativos contra BoHV-1, dentro de éstos 2 establecimientos, el primero con un n=6 animales y el segundo un n=4 animales analizados. El establecimiento con mayor prevalencia se ubicó en Durazno, con 87,5% de animales seropositivos.

En cuanto a BoHV-4, se diagnosticaron animales seropositivos en las muestras analizadas. Se evaluaron 545 muestras al azar de las 655 totales. La seroprevalencia fue de 27,34% (149/545), de las cuales un 8,99% (49/545) fueron positivos fuertes, mientras que un 18,35% (100/545) fueron positivos débiles (Tabla 1).

Tabla 1. Serología contra BoHV-4 en el total de muestras analizadas y discriminadas por departamento.

	Durazno	Florida	Tacuarembó	Total
Positivo fuerte	7 (1,28%)	6 (1,10%)	36 (6,61%)	49 (8,99%)
Positivo débil	39 (7,16%)	8 (1,47%)	53 (9,72%)	100 (18,35%)
Negativo	181 (33,21%)	45 (8,26%)	170 (31,19%)	396 (72,66%)
	227 (41,65%)	59 (10,83%)	259 (47,52%)	545 (100%)

La prevalencia serológica total contra Leptospirosis fue de 19,85% (130/655). Separado por departamentos, la prevalencia fue de 11,76%, 16,79%, y 24% para los departamentos de Florida Durazno, y Tacuarembó respectivamente. En cuanto a los serovares estudiados, muchos animales serológicamente positivos a *Leptospira*, presentaron anticuerpos contra más de un serovar. Los resultados de los serovares sobre el total de casos seriológicamente positivos a *Leptospira* (130/655) fueron los siguientes: *tarassovi* 76,92% (100/130), *hardjo* 71,54% (93/130), *hardjo bovis* 56,92% (74/130), *hebdomadis* 30,77% (40/130), *wolffi* 16,15% (21/130), *icterohaemorrhagiae* 11,54% (15/130), *bratislava* 3,85% (5/130), *pyrogens* 3,85% (5/130), *pomona* 3,08% (4/130), *canicola* 3,08% (4/130), *grippotyphosa* 0,77% (1/130), *ballum* 0%(0/130) (Figura 2).

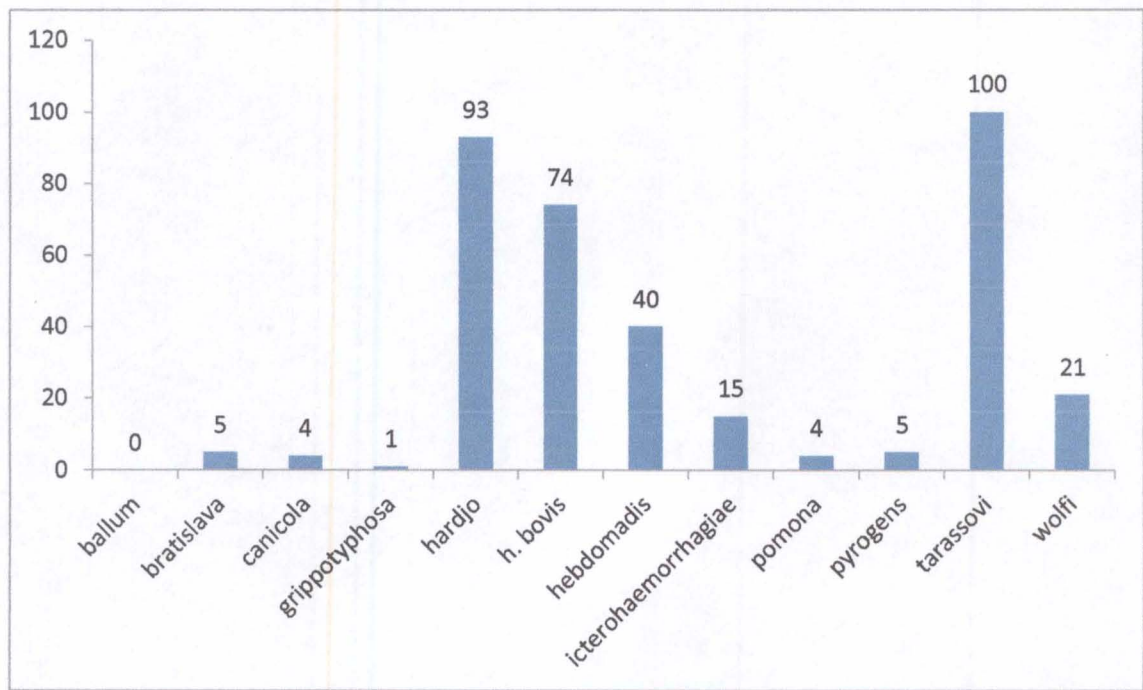


Figura 2. Número de animales seropositivos a Leptospirosis discriminado según los serovares analizados, tomando en cuenta únicamente las muestras seropositivas a *Leptospira* spp.

Del total de animales estudiados no se diagnosticaron seropositivos a Brucelosis Bovina.

Con respecto a Clamidia, de un total de 432 muestras analizadas los resultados serológicos fueron los siguientes: positivos 33,10% (143/432), dudosos 10,65% (46/432) y negativos 56,25% (243/432) (Tabla2).

Tabla 2. Serología contra Clamidiosis en el total de muestras analizadas y discriminadas por departamento.

Serología	Durazno	Florida	Tacuarembó	Total
Positivo	66(27,16%)	15(24,19%)	62(45,25%)	143 (33,10%)
Dudoso	25(10,72%)	10(16,13%)	11(8,03%)	46 (10,65%)
Negativo	142(60,94%)	37(59,67%)	64(46,72%)	243 (56,25%)
	233(53,94%)	62(14,35%)	137(31,71%)	432(100%)

La seroprevalencia de Neospora fue de 29,82% (130/436), de un total de 436 muestras. Por departamentos la prevalencia fue de 23,63% en el departamento de Durazno, de 30,65% en el departamento de Florida y de 40,15% en Tacuarembó (Tabla 3).

Tabla 3 Serología contra Neosporosis en el total de muestras analizadas y discriminadas por departamento.

Serología	Durazno	Florida	Tacuarembó	Total
Positivo	56 (12,84%)	19 (4,36%)	55 (12,61%)	130 (29,82%)
Negativo	181 (41,52%)	43 (9,86%)	82 (18,81%)	306 (70,18%)
	237 (54,36%)	62 (14,22)	137 (31,42%)	436 (100%)

La prevalencia serológica encontrada por enfermedad en el total de muestras analizadas, se puede ver en el Tabla 4.

Tabla 4. Situación serológica para cada enfermedad en la población estudiada.

	Positivos	Negativos	Total	Prevalencia %
DVB	651	4	655	99,39
BoHV-1	296	359	655	45,19
Clamidiosis*	143	243	386	37,05
Neosporosis	130	306	436	29,82
BoHV-4	149	396	545	27,34
VLB	131	524	655	20
Leptospirosis	130	525	655	19,85
Brucelosis	0	655	655	0

*No se tomaron en cuenta los resultados "dudosos" descritos por el kit comercial.

Cuando se relacionó la seropositividad contra VLB y las enfermedades reproductivas estudiadas, se pudo observar que algunas enfermedades estaban relacionadas

entre sí (Figura 3). Una asociación positiva se encontró entre VLB/BoHV-1 y VLB/Leptospirosis con $p=0,002$ (Figura 4) y $p=0,028$ (Figura 5) respectivamente.

Para Neospora, Clamidia y BoHV-4 la asociación no fue significativa, mientras que para BVD y brucelosis no se pudo determinar, debido al hecho de que en el primer caso el 99% de los animales eran seropositivos y para brucelosis el 100% eran seronegativos por la técnica de Rosa de Bengala.

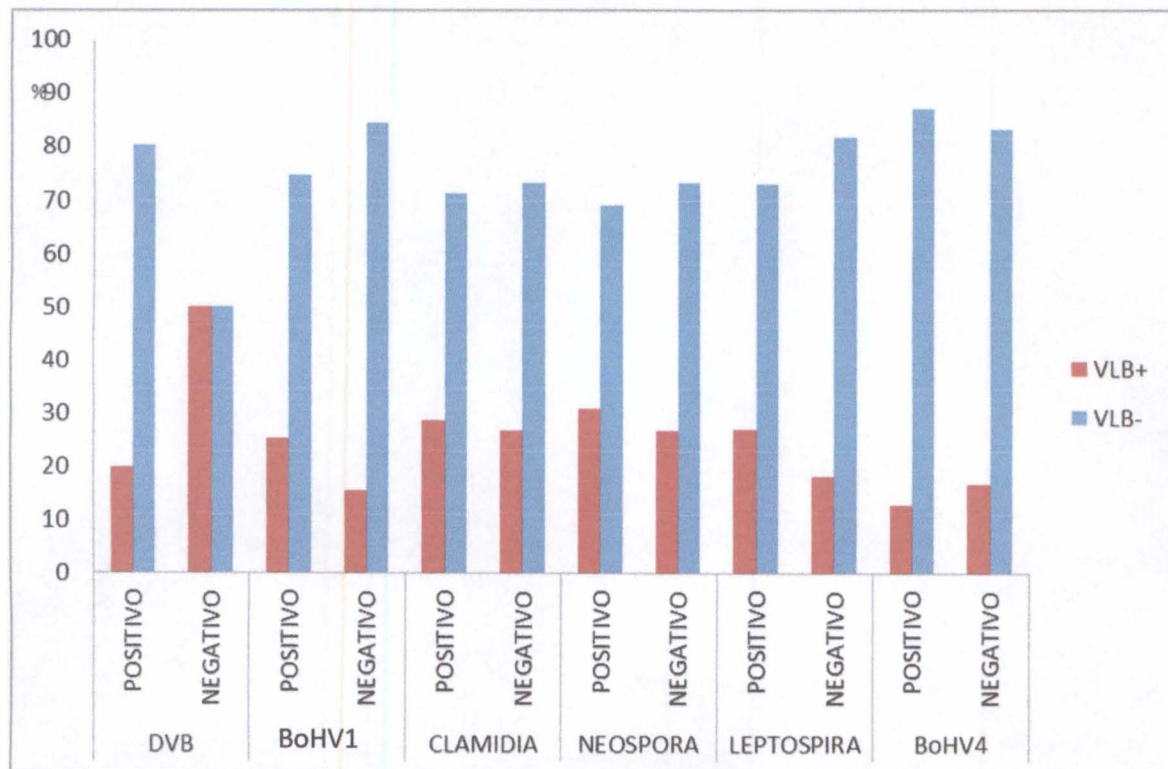


Figura 3. Prevalencia por enfermedad según serología al virus de la Leucosis bovina (VLB).

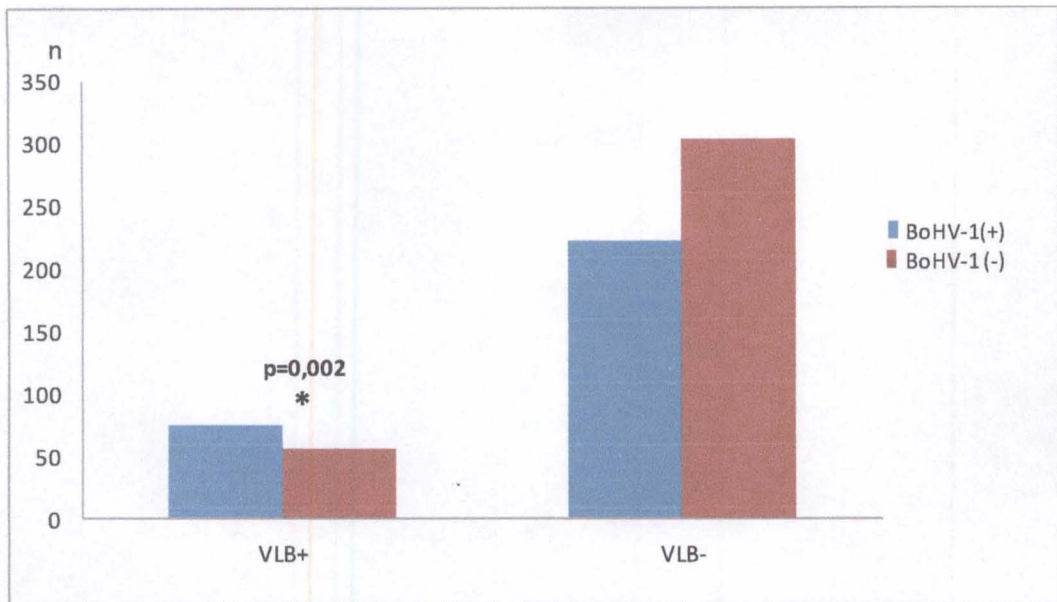


Figura 4. Relación entre virus de la Leucosis bovina (VLB) y Herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1).

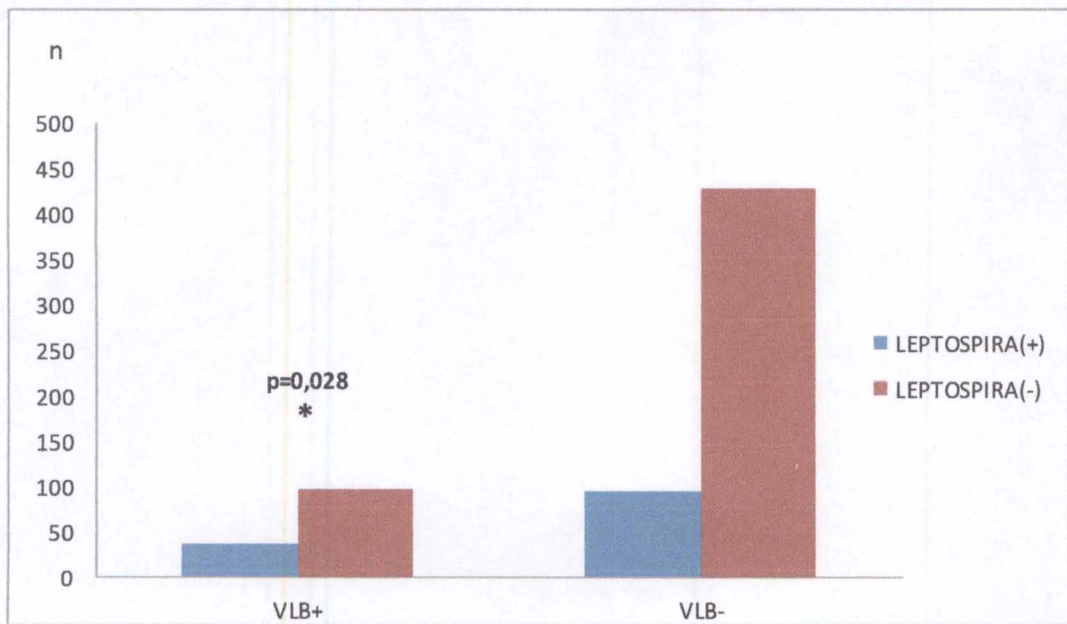


Figura 5. Relación entre virus de la Leucosis bovina (VLB) y leptospira.

9. Discusión y Conclusiones

El VLB 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, habiéndose instaurado desde hace muchos años una selección negativa en los rodeos Uruguayos en cuanto a VLB. Sin embargo, también se sabe que la infección causa pérdidas productivas directa e indirectamente, como por ejemplo una disminución en la producción láctea (Bartlett y col., 2014), un desbalance a nivel de la respuesta inmune (Kabeya y col., 2001; Erskine y col., 2011; Puentes y col., 2016a), así como posiblemente impacte también en la performance reproductiva (VanLeeuwen y col., 2010, Puentes y col., 2016b). 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 (Langston y col., 1978; Huber y col., 1981; Brenner y col., 1989; D'Angelo y col., 1997).

Paralelo a esto, es clara la problemática que existe a nivel del país con los bajos índices de procreo. En el anuario DIEA 2017 se observa una diferencia de aproximadamente 35% entre el número de vacas entoradas y el número de terneros obtenidos (4.215.000 y 2.702.000 respectivamente). Una de las explicaciones a este bajo porcentaje (64%) es atribuible a enfermedades infecciosas en la reproducción tales como las estudiadas en este trabajo. Para estas no existen campañas sanitarias (salvo brucelosis) quedando a criterio de cada productor el uso de vacunas comerciales preventivas. No se ha tenido en cuenta enfermedades inmunosupresoras y de alta prevalencia como la VLB que afecta de forma directa e indirectamente. Nuestros resultados intentan realizar un aporte a las investigaciones existentes que demuestran el efecto negativo del VLB directa o indirectamente sobre aspectos sanitarios en bovinos de leche (Vanleeuwen y col., 2010; Erskiney col., 2012; Puentes y col., 2016).

En Uruguay, hasta la fecha han sido muy escasas las investigaciones que se han publicado sobre este virus y su importancia a nivel productivo. Básicamente se ha limitado a estudios de prevalencia de la enfermedad en ganado lechero (Zaffaroni y col., 2007; Furtado y col., 2012). Furtado y col empleando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) con el mismo banco de sueros que el utilizado en este trabajo, obtuvo una seroprevalencia al VLB de 10,4%, menor a la obtenida en este estudio (20%). Discriminada por departamento, si bien la relación se mantuvo, en nuestro trabajo hay una mayor prevalencia (Durazno 11% vs 20,3%, Florida 14% vs 22,06 y Tacuarembó 9% vs 19,38). Esta diferencia se debe a que nosotros utilizamos una técnica de diagnóstico más sensible (ELISA) que Furtado y col., que utilizaron IDGA. Este trabajo va más allá del estudio de la prevalencia de VLB, ya que el objetivo además fue abordar algunos aspectos de la infección en su forma subclínica, observando el posible impacto que pudiera tener el virus a nivel sanitario.

En cuanto a los resultados 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 ($p=0,002$) y Leptospirosis ($p=0,026$). Estos hallazgos son muy importantes, teniendo

en cuenta que se trata de dos de las principales enfermedades infecciosas de la reproducción en bovinos y se podrían vincular a como VLB podría participar en los trastornos de la reproducción, producción y sanidad de los rodeos en acuerdo con lo que han publicado otros autores (Junwook Chi y col., 2002; García y col., 2000; VanLeeuwen y col., 2010; Bartlett y col., 2014). En este caso, al encontrarse una asociación positiva entre estos patógenos, 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 de protección. En ese sentido, no existen publicaciones similares que permitan comparar o apoyar estos resultados. Sin embargo, Pyeon y col., (2000) revelan posible asociación entre VLB con BoHV-1 y con *Brucella abortus*. En sus experimentos, ellos 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. Más recientemente, Frie y col. (2016) demostraron mediante el uso de una vacuna comercial que vacas VLB positivas producen significativamente menores títulos de IgM, y de IgG2 contra BoHV-1, *L. hardjo* y *L. Pomona*. Esto podría llegar a explicar la asociación positiva entre VLB y BoHV-1, VLB y leptospira encontrada en el presente estudio. Las células T de vacas VLB positivas mostraron una mayor respuesta a la estimulación in vitro, aunque no se observaron diferencias en la activación de células T CD4 + o T CD8 +. Finalmente, las células B de vacas VLB positivas exhibieron mayor expresión de CD25 y expresión de MHCII reducida en respuesta a la estimulación in vitro. Esto apoya la hipótesis de que las vacas VLB positivas responden diferente a la vacunación comparando con animales VLB negativos (Frie y col. (2016). Algunos ensayos han demostrado que vacas lecheras infectadas con VLB, generan una respuesta inmune menor después de la vacunación, aunque esta menor respuesta no es una supresión global de la actividad de las células B y T. Vacas VLB positivas produjeron títulos más bajos de IgG2 en respuesta a la vacuna contra *E. coli* J5 utilizada contra la mastitis (Erskine y col., 2011a). Aunque los títulos de IgM e IgG1 no se vieron afectados en este experimento. Por otro lado, otro ensayo en ese mismo sentido encontró que las vacas VLB positivas produjeron menor títulos de IgM e IgG1 en respuesta al virus de la fiebre aftosa (FMDV), mientras que los títulos de IgG2 fueron equivalentes entre VLB- y vacas VLB + (Puentes y col., 2016). Estos antecedentes, sumados a los resultados a campo de esta tesis, deben ser profundizados en futuros experimentos, para conocer con precisión las interacciones entre VLB y otros patógenos de interés productivo en bovinos.

Las pruebas serológicas constituyen una herramienta de diagnóstico de elección para numerosas enfermedades. Estas pruebas determinan indirectamente la frecuencia y la distribución de un agente infeccioso en determinada población a través de la detección de anticuerpos específicos. Un resultado positivo indicaría entonces la exposición de un animal a un agente en algún momento previo al estudio, pudiéndose encontrar en el momento de la prueba en periodo de incubación, enfermo, recuperándose o sano; por lo tanto no podemos determinar que la presencia de anticuerpos a estas enfermedades sean las causantes de los problemas reproductivos.

En este estudio se encontraron dos predios seronegativos contra BoHV-1. Si bien el número de animales estudiados en cada uno de esos predios es bajo no podemos asegurar que los animales en esos predios sean verdaderamente seronegativos al

virus. Fue demostrado por Puentes y col., 2016c que las pruebas serológicas (SN y ELISA) detectaron un 29 % menos de animales positivos a BoHV-1 que las pruebas moleculares (PCR). Esta diferencia es debida a la presencia del virus en forma latente en el ganglio trigémino que no puede ser detectado por el nivel de anticuerpos circulantes. Estos resultados podrían estar indicando que la prevalencia contra BoHV-1 podría ser aún mayor a la encontrada. Esta misma situación podría estar ocurriendo con las demás técnicas serológicas y por lo tanto es una limitante en nuestro estudio a la hora de saber con exactitud el status sanitario de los animales para cada enfermedad.

Este trabajo aporta otra información relevante para el país en cuanto a BoHV-4, debido a que este es el primer diagnóstico de este virus en el país con una seroprevalencia del 27,3 %. En cuanto a clamidia se encontró una prevalencia del 33,1%, similar a los reportados por Cattaneo y col., en las jornadas de Buiatría 2009 (28%), debiéndose tenerlos en cuenta ya que en los dos trabajos se muestran solo la seroprevalencia y no como afecta a nivel reproductivo la enfermedad.

En conclusión, este trabajo presenta los resultados de seroprevalencia contra varias enfermedades infecciosas de interés para el país a partir de un banco de suero existente en el Departamento de Ciencias Microbiológicas, y demuestra que existe una asociación natural entre animales seropositivos a VLB, y seropositivos a BoHV-1 y Leptospirosis; de manera que se podría discutir que VLB afectaría indirectamente la performance reproductiva de los rodeos, y por lo tanto la performance productiva, facilitando el ingreso al organismo de estos patógenos. A partir de los resultados obtenidos, más investigaciones deben ser realizadas buscando confirmar estos resultados y buscando identificar interacciones entre VLB y otros patógenos de interés productivo en bovinos.

10. Bibliografía

- 1) Acha P.N.; Cifres B. (1989). Zoonoses Maladies transmisibles comunes a l'homme et aux animaux. 2a ed, Paris, O.I.E. 1063 p.
- 2) Aida Y.; Miyasaka M.; Okada K.; Onuma M.; Kogure S.; Suzuki M.; Minoprio P.; Levy D.; Ikawa Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 50: 1946-1951.
- 3) Albarracín F.E. (2010). Clamidiosis Bovina. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca. Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3060/1/mv176.pdf>. Fecha de consulta 9/5/17.
- 4) Amills M.; Ramiya V.; Norimine J.; Olmstead C.; Lewin H. (2002). Reduced IL-2 and IL-4 mRNA Expression in CD4+ T Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected Cows with Persistent Lymphocytosis. *Virology*. 304(1): 1-9.
- 5) Anderson M.L.; Blanchard P.C.; Barr B.C.; Dubey J.P.; Hoffman R.L.; Conrad P.A. (1991) Neosporalike protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Assoc.* 198: 241-244.

- 6) Anderson M.L.; Andrianarivo A.G.; Conrad P.A. (2000) Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sci.* 60- 61: 417-431.
- 7) Arbelaez S.; Rivera H.; Pezo D.; Garcia W. (2002) Detección de anticuerpos contra pestivirus de una comunidad campesina de la provincial de Canchas, Cusco. *Rev Inv Peru* 13(1): 46-51.
- 8) Arboleda J.; Rodas J.; Ossa J.; Zuluaga F. (1996). Espectro clínico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 9(1-2): 3-13.
- 9) Asano A.; Inoshima Y.; Murakami K.; Iketani Y.; Yamamoto Y.; Sentsui H. (2003) Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues. *J Vet Med Sci.* 65: 87-93.
- 10) Avila M.; Rodríguez M.; Díaz de Arce H.; Barrera M. (2008). Virological diagnostic of Bovine herpesvirus type-1. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria.* 9 (3). Disponible en www.researchgate.net/profile/Maritza_Barrera2/publication/26500331_Diagnostico_virologico_de_Herpesvirus_bovino_tipo_1_Virological_diagnostic_of_Bovine_herpesvirus_type1/links/00b7d51759600746d000000/Diagnostico-virologico-de-Herpesvirus-bovino-tipo-1-Virological-diagnostic-of-Bovine-herpesvirus-type-1.pdf . Fecha de consulta: 25/3/17.
- 11) Ayulo V.; Dammert O. (2001). Incidencia de la infestación con leptospira hardjo en las ratas grises. *Revista de Medicina Veterinaria.* 6: 93-100.
- 12) Babiuk L.A.; Van Drunen; Tikoo S. K.(1985) Effect of bovine a Interferon on Bovine Herpesvirus Type-1 induced Respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 53: 31-42.
- 13) Baker J.C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458.
- 14) Bañales P.; Easton C.; Haritiani M.; Kashiwazaki Y.; Paullier C.; Pizzorno, M. (1999). Aborto bovino por Neospora caninum en el Uruguay: Primeros diagnósticos. *Veterinaria (Montevideo).* 34: 28-32.
- 15) Barber J.S.; Glasser R.D.; Ellis J.; Reichel M.P.; Mc Millan D.; Trees A.J. (1997). Prevalence of antibodies to Neospora caninum in different canid populations *J.Parasitol.*, 83(6): 1056-1058.
- 16) Barozzi J. (1993). Informe de la revisión y análisis preliminar de la información básica para el estudio de factibilidad del proyecto: «Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis bovina e implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica, prevención y evaluación del impacto de enfermedades crónicas y complejos subclínicos en la ganadería uruguaya». Convenio OCT/RCUR-2/92. MGAP. FONPLATA.
- 17) Bartlett P.C.; Sordillo L.M.; Byrem T.M.; Norby B.; Grooms D.L.; Swenson C.L.; Zalucha J.; Erskine R.J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 244(8):914-922.
- 18) Baruta D.A.; Ardoino S.M.; Brandan J.L.; Sosa R.E.; Mariani E.L.; Albretch E.M. (2011). Leucosis bovina enzootica. *Ciencia Veterinaria.* 13(1):9-16.

- 19) Beier D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) 2ª ed. Paris. Ed. OIE, (723-738).
- 20) Bendixen H.J. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: Leukosis Enzootica bovis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 108:1241-1267.
- 21) Bermúdez V. (2006). Importancia del control de *Leptospira borgpeterseni* serovar hardjo tipo hardjo bovis en el rebaño bovino. Venezuela Bovina 22 (71):37-40.
- 22) Bielefeldt Ohmann H. (1995). The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. Vet Clin North Am Food Anim. Pract. 11:447-476.
- 23) Bjerkas I.; Mohn S.F.; Presthus J. (1984) Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70:271-274.
- 24) Brasseur R.; Cornet B.; Burny A.; Vandenbranden M.; Ruyschaert J.M. (1988). Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. Aids. Res. Hum. Retrovir. 4:83-90.
- 25) Burny A.; Cleuter Y.; Kettmann R.; Mammerickx M.; Marbaix G.; Portetelle D.; Van den Broeke A.; Willems L.; Thomas M. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Adv Vet Sci Comp Med. 32:149-170.
- 26) Buxton, B.A.; Hinkle, N.; Schultz, R. (1985); "Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies and tabanids". Am. J. Vet. Res., 46: 123 - 126.
- 27) Canale-Parola E. (1984). Spirochaetales. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg N.R.; Holt J.G. (Eds.) Williams & Wilkins, Ed. Baltimore. 1:38-39.
- 28) Casas Olascoaga, R. (1976). Diagnóstico serológico de la Brucelosis, Bol. Centr. Panam. Zoonosis 14 (3-4):107-141.
- 29) Cattáneo M.; Moreno J.; Marmo F.; Bermúdez J. (2009). Primer diagnóstico serológico de Clamidiosis (*Chlamydia abortus*) en vacas lecheras del Uruguay. Veterinaria. 45(173):62.
- 30) Celedon M.O.; Roco L.; Quinteros G.; Santibañez M.; Berrios P. (1997). Puesta en evidencia del virus diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Arch. Med. Vet. 29 (2):189-195.
- 31) Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. REDVET. 6(7):2-25. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf>. Fecha consulta: 8/4/15
- 32) Chans L. (2003). Legislación nacional e internacional de relevancia sobre Brucelosis Bovina. Jornada de actualización Técnica. 21/03/2003, La Paloma Rocha. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Capacitación/JornadasBrucelosis/AspectosLegalesDrChans.zip>. Fecha consulta: 7/7/17.

- 33) Chi J.; VanLeeuwen J.; Weersink A.; Keefe G. (2002) Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med.* 55:137-153.
- 34) Conrad P.A.; Barr B.C.; Sverlow K.W.; Anderson M.; Daft M.; Kinde H. (1993) In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine fetuses. *Parasitology.* 106: 239-249.
- 35) De Brun M.L.; Algorta A.; Alvarez J.P.; Puentes R. (2013). Transmisión de la Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p 195-196.
- 36) De la Sota, M.D. (2004). Manual de procedimientos Leucosis Bovina E. Enzootica, 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. Fecha de consulta: 15/9/16.
- 37) De Regge, N.; Favoreel, H. W.; Geenen, K. y Nauwynck, H. J. (2006): A homologous in vitro model to study interactions between alpha herpesviruses and trigeminal ganglion neurons. *Vet. Microbiol.* 113: 251-255.
- 38) Den-Broeke A.; Cleuter Y.; Beskorwayne T.; Kerkhofs P.; Szynal M.; Bagnis C.; Burny A.; Griebel P. (2001). CD154 costimulated ovine primary B cells, a cell culture system that supports productive infection by bovine leukemia virus. *J Virol.* 75(3):1095-103.
- 39) Deregt D.; Loewen K.G. (1995). Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 36: 371-377.
- 40) Diaz E.; Aguilar F.; Vasquez J. (2005). Manual para el diagnóstico de enfermedades en ovinos y caprinos en México 2005, [internet], 2005 [Citado el 9 de Mayo del 2011]. Disponible en: <http://fmvzenlinea.fmvz.unam.mx/file.php/86/CONASA.PDF>. Fecha consulta 6/7/17.
- 41) Dirksen G.; Grunder H.; Stober M. (2005). Medicina Interna y Cirugía del bovino, 4a ed. Ciudad, Intermédica, 292p.
- 42) Donis R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 11: 393-423.
- 43) Donofrio G.; Cavirani S.; Flammini C.; Scatozza F. (2000) Molecular typing of a BoHV-4 (bovine herpesvirus 4) field isolate. *Vet Res Commun*, 24:411-422.
- 44) Donofrio G.; Cavirani S.; van Santen V.; Flammini C. (2005) Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. *J Clin Microbiol.*, 43:3421-3426.
- 45) Donofrio G.; Herath S.; Sartori C.; Cavirani S.; Flammini C.; Sheldon M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction.*, 134:183-197.
- 46) Donofrio G.; Ravanetti L.; Cavirani S.; Herath S.; Capocefalo A.; Sheldon I. (2008). Bacterial infection of endometrial cells influences bovine herpesvirus 4

immediate early gene activation: a new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction.*, 136:361-366.

47) Drake T.R.; Moore D.A.; Whitlock R.H.; Castro A.E.; Hat-tel A.L.; Reams R.; Stoffregen W. (1996). An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 208.

48) Dubey J.P. (1999) Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 1160-1163.

49) Dubey J.P. (2003) Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89:542-546.

50) Dubey J.P.; Carpenter J.L.; Speer C.A.; Topper M.J.; Uggla A. (1988) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1269-1285.

51) Dubuisson J.; Guillaume J.; Boulanger D.; Thiry E.; Bublot M.; Pastoret P. (1990). Neutralization of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J Gen Virol.* 71:647-653.

52) Easton C.; Paullier C.; Bañales P.; Repiso M.; Herrera B. (2003). Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE "Miguel C.Rubino". *Veterinaria (Montevideo)* 38 (152- 153): 25-30

53) Egyed L.; Sassi G.; Tibold J.; Mádl I.; Szenci O. (2011) Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microb Path.* 50:322-325.

54) Elhassan A.; Fadol M.; El-Husseim A. (2011). Seroprevalence of bovine herpesvirus-1, bovine herpesvirus-4 and bovine viral diarrhea virus in dairy cattle in Sudan. *Pak Vet J.*, 31:317-320.

55) Ellis W.A. (2001). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 10:463-478.

56) Engels M.; Ackermann M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microb.* 53:3-15.

57) Erskine R.J.; Bartlett P.C.; Byrem T.M.; Render C.L.; Febvay C.; Houseman J.T. (2012) Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 95(2):727-34.

58) Erskine R.J.; Corl C.M.; Gandy J.C.; Sordillo L.M. (2011a). Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 72:1059-1064.

59) Erskine R.J.; Bartlett P.C.; Sabo K.M.; Sordillo L.M. (2011b). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int.* ID 3:915747, 5p.

60) Essmail M.; Baker D.; Collins J.; Vandewoude S.; Salman M.; Hegazy A. (1999). Dot immunobinding assay for detection of bovine herpesvirus 4 antibodies in rabbits. *J Vet Diagn Invest.*, 11:237-239.

- 61) Fauquet C.M.; Mayo M.A.; Maniloff J.; Desselberger U.; Ball L.A. (2005): Virus Taxonomy. 8 th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162p.
- 62) Favoreel H.W.; Nauwynck H.J.; Pensaert M.B. (2000): Immunological hiding of herpesvirusinfected cells. *Arch. Virol.* 145(7): 1269 – 1290.
- 63) Favoreel H.W.; Van Minnebruggen G.; Van de Walle G.R.; Ficinska J.; Nauwynck H.J. (2006): Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: Bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies. *Vet. Microbiol.* 113: 257-263.
- 64) Felmer R.; Zúñiga J.; Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38(2):137-141.
- 65) Fenner F.; Bachmann A.P.; Gibbs J.E.P.; Murphy A.F.; Studdert J.M; White O.D. (1992). Retroviridae. En: Fenner F., Bachmann A.P., Gibbs J.E.P., Murphy A.F., Studeert J.M., White O.D. *Virologia Veterinaria*. Zaragoza. Acribia. p. 571- 600.
- 66) Fray M.D.; Mann G.E.; Clarke M.C.; Charleston B. (1999). Bovine viral diarrhea virus: its effects on estradiol, pro-gesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51: 1533–1546.
- 67) Frazier K.; Baldwin C.; Pence M.; West J.; Bernard J.; Liggett A.; Miller D. (2002). Hines II M. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J Vet Diagn Invest.*, 14: 457-462.
- 68) Fredriksen B.; Sandvik T.; Loken T.; Odegaard S.A. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144: 111–114.
- 69) Frie M.C.; Sporer K.R.; Wallace J.C.; Maes R.K.; Sordillo L.M.; Bartlett P.C.; Coussens P.M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 182:125–135.
- 70) Frie M.C.; Sporer K.R.; Benitez O.J.; Wallace J.C.; Droscha C.J.; Bartlett P.C.; Coussens P.M. (2017). Dairy cows naturally infected with Bovine leukemia Virus exhibit abnormal B- and T-cell Phenotypes after Primary and secondary exposures to Keyhole limpet hemocyanin. *Front. Vet. Sci.* 4:112. doi: 10.3389/fvets.2017.00112.
- 71) Fulton B.E.; Portella M.; Radke K. (2006). Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. *J. Virol.* 80(16):7873.
- 72) Furtado A.; Rosadilla D.; Franco G.; Piaggio J.; Puentes R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria.* 49(191):29-37.
- 73) Gallo R.; Wong-Staal F. (1990) Retrovirus Biology and Human Disease. En: Gallo R.C.; Wong-Staal F. (eds) *Retrovirus Biology and Human Disease*. New York, Basel, Marcel-Dekker, inc. pp.130–155.

- 74) García F., Calderón A., Almansa J., Garzón C., Márquez D., Jiménez G., Jaramillo F. (2000). Efectos de la infección por el virus de la leucosis bovina sobre la producción y reproducción en un hato lechero. *Rev. FMVZ.* 47(2):39-44.
- 75) Gibson da Silva F.; De Freitas J.C.; Müller E. (2006) *Chlamydia abortus* em animais de produção. *Ciencia Rural* 36 (1): 342-348.
- 76) Gil A.; Piaggio J. (2013). *Brucelosis Bovina: Evaluación de las pruebas diagnósticas para muestras compuestas de leche y modelos epidemiológicos de difusión de la enfermedad.* INIA Serie: FPTA N° 36, 69p.
- 77) Gil A.; Silva M.; Garin A.; Caponi O.; Chans L.; Vitale E. (2003). Estudio transversal de la brucelosis bovina en el Uruguay. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 3p.
- 78) Gil A.; Sienna R.; Guarino H.; Piaggio J.; Arrillaga C. (2000). Sistema de monitoreo en Salud Animal: Primera experiencia en ganado lechero en el Uruguay. *XXI Congreso Mundial de Buiatría. Punta del Este, Uruguay.* p 122.
- 79) Gillet N.; Florins A.; Boxus M.; Burteau C.; Nigro A.; Vandermeers F.; Balon H.; Bouzar A.; Defoiche J.; Burny A.; Reichert M.; Kettmann R.; Willems L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4:18.
- 80) González E.T.; Oliva G.A.; Valera A.; Bonzo E.; Licursi M.; Etcheverrigaray M.E. (2001) Leucosis enzoótica bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Analecta Veterinaria* 21(2):12-20.
- 81) Grieshaber N.; Grieshaber S.; Fisher E.; Hackstadt T. (2006). "A small RNA inhibits translation of the histone-like protein Hc1 in *Chlamydia trachomatis*." *Mol Microbiol.* 59(2):541–550.
- 82) Grooms D.L.; Brock K.V.; Pate J.L.; Day M.L. (1998). Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* 49: 595–605.
- 83) Guarino H.; Maisonnave J.; Capano F.; Pereira J. (1982). Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina en Uruguay. *Veterinaria* 78: 131-134.
- 84) Guarino H. (1997). Herpesvirus bovino-1: Algunas consideraciones y su situación en Uruguay. *Jornadas de patología reproductiva en bovinos. Jornadas de Patología Reproductiva en Bovinos, Colonia Suiza, Uruguay,* p. 85-90.
- 85) Guarino H.; Núñez A.; Repiso M.V.; Gil A.; Dargatz D.A.(2008) Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med.* 85(1- 2):34-40.
- 86) Gutiérrez G.; Carignano H.; Alvarez I.; Martínez C.; Porta N.; Politzki R.; Gammella M.; Lomonaco M.; Fondevila N.; Poli M.; Trono K. (2012). Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet. Res.* 8:187.

- 87) Hage J.J.; Schukken Y.H.; Dijkstra T.; Barkema H.W.; Van Valkengoed P.H.R.; Wentink G.H. (1998). Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev. Vet. Med.*, 34: 97–106.
- 88) Heeney J.; Valli V.E.; Montesani J. (1998). Alterations in humoral immune response to bovine leukemia virus antigens in cattle with lymphoma. *J Gen Virol.* 69: 659-666.
- 89) Hodgson P.D.; Aich P.; Manuja A.; Hokamp K.; Roche F.M.; Brinkman F.S.L.; Potter A.; Babiuk L.A.; Griebel P.J. (2005): Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comp. Funct. Genom.* 6:244–250.
- 90) Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microb.* 64: 89-107.
- 91) Johnson R.; Kaneene J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull* 62(4): 287-312.
- 92) Jones C.; Geiser V.; Henderson G.; Jiang Y.; Meyer F.; Pérez S.; Zhang Y. (2006). Functional analysis bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 113 (3-4): 199-210.
- 93) Kaashoek M.J.; Moerman A.; Madic J.; Rijsewijk F.A.; Quak J.; Gielkens A.L.; Van Oirschot J.T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, 12: 439–444.
- 94) Kabeya H.; Ohashi K.; Onuma M. (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63(7):703-708.
- 95) Kale M.; Ata A.; Kocamüftüoğlu M.; Hasircioğlu S. (2011). Bovine herpes virus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Acta Vet Beograd.*, 61: 13-19.
- 96) Kelling C.L. (1996). The effects of BVDV infection on cattle. *Vet. Med.* 91: 862–863.
- 97) Kettmann R.; Burny A.; Callebaut I.; Droogmans L.; Mammerick M.; Willens L.; Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus. En: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*. Ciudad, Plenum, p 39-81.
- 98) Knowles D. (2011). Herpesvirales. En: MacLachlan N.J.; Dubovi E.J. *Fenner's veterinary virology*. 4a ed., Academic press. pp. 179-201.
- 99) Kuckleburg C.; Chase C.; Nelson E.; Marras S.; Dammen M.; Christopher-Hannings J. (2003). Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest.* 1:72-76.
- 100) Láguna A.V. (2005) Epidemiología de la Leptospirosis bovina. *Revista del Instituto de Zoonosis e Investigación Pecuaria.* 2: 40-44.
- 101) Lértora W.J. (2003) Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet.* 14(1): 42-51.
Disponibile en:

http://www.produccionbovina.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/34-diarrea_viral_bovina.pdf.

102) Lewin, H.A., Bernoco, D. (1986). Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim. Genet.* 17:197-207.

103) Lindsay D.S.; Lenz S.D.; Dykstra C.C.; Blagburn B.L.; Dubey J.P. (1998) Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 84: 311-315.

104) Lomonte P.; Bublot M.; van Santen V.; Keil G.; Pastoret P.; Thiry E. (1996). Bovine herpesvirus 4: genomic organization and relationship with two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Vet Microbiol.*, 53: 79-89.

105) Lomonte P.; Filee P.; Lyaku J.; Bublot M.; Pastoret P.; Thiry E. (1997). Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. *J Virol.*, 71: 3332-3335.

106) Lüchter F. (2004). Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. *Enfermedades infecciosas de los Rumiantes*. Buenos Aires. Editorial Universitaria de la Patagonia. p.123-143.

107) Luciw P.; Leung N. (1994). Mechanisms of Retrovirus Replication. En: Levy J.A.; *The Retroviridae*. New York, Plenum Press. p.159-263.

108) Marshak R.R. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:243-263.

109) Martínez P.J.; Riveira L.M. (2008) Antecedentes, generalidades y actualización de aspectos de patogénesis, diagnóstico y control de la Diarrea Viral bovina (DVB) y rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR). Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá D.C. Julio 2008. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis122.pdf>. Fecha de consulta: 11/3/17.

110) McAllister M.M.; Dubey J.P.; Lindsay D.S.; Jolley W.R.; Wills R.A.; McGuire A.M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1473-1478.

111) McGowan M.R.; Kafi M.; Kirkland P.D.; Kelly R.; Bielefeldt Ohmann H.; Occhio M.D.; Jillella D. (2003). Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066

112) Mederos A.; Irigoyen D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 19-20.

- 113) MGAP- DIEA (2017). Anuario Estadístico Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU;,%EF%BF%BD>. Fecha de consulta: 20/2/18
- 114) MGAP (2017) Decreto 148/2017 Monitoreo sobre brucellosis Bovina en Uruguay.. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
- 115) Michna S.W. (2004). Leptospirosis. Vet. Rec. 86: 484-496.
- 116) Moennig V.; Liess B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 11: 477-487.
- 117) Moore D.P.; Odeón A.C.; Venturini M.C.; Campero C.M. (2005) Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista Argentina de Microbiología. 37: 217- 228.
- 118) Morán P.; Pérez S.; Odeón A.; Verna A.E. (2015). Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 47(2): 155-166.
- 119) Murphy F.A.; Gibbs E.P.J.; Horzinek M.C.; Studdert M.J. (1999): Veterinary Virology, 3a ed. Academic Press. London, Inglaterra Academic Press. 629 p.
- 120) Naeem K.; Murtaugh M.; Goyal S. (1991) Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. Arch Virol., 119: 239-255.
- 121) Nettleton P.F.; Entrican G. (1995). Ruminant Pestiviruses. Br. Vet. J. 151: 615-642
- 122) Nicolet J. (1985). Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria, Buenos Aires, Acribia. 245 p.
- 123) Nicolettil P. (2002). A short history of brucellosis. Veterinary Microbiology 90:5-9.
- 124) Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. Veterinary Microbiology 90:447-459.
- 125) Nuñez A.; Gil A.; Guarino H.; Sierra R.; Piaggio J.; Zaffaroni R. (2000). Estudio de prevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en rodeos lecheros del Departamento de Florida. Rev Vet. 40(157): 5-28.
- 126) Obando C.A.R. (1994): Problemas Respiratorios, entéricos y reproductivos en ganado bovino, ocasionados por virus. Fonaiap Divulga. 45: 1-7.
- 127) OIE (2004) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres. Capítulo 2.2.4. Leptospirosis. 5ª ed, Paris, OIE 1:343-355.
- 128) OIE (2004) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres. Capítulo 2.3.4. Leucosis Bovina Enzoótica. 5ª ed, Paris, OIE 1:503-513.

- 129) OIE (2004) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres. Capítulo 2.3.5. Rinotraqueitis Bovina Infecciosa. 5ª ed, Paris, OIE 1:514-525.
- 130) OIE (2004) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres. Capítulo 2.10.6. Diarrea Viral Bovina. 5ª ed, Paris, OIE 2:1127-1140.
- 131) Perez J.; Storz J. (1987) Chlamydia: Biología básica propiedades antigénicas y potencial patogénico; Cien. Vet.; Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revisitas/CVvol4/CVv4c6.pdf>. Fecha de consulta: 10/3/17
- 132) Portetelle D.; Dandoy C.; Burny A.; Zavada J.; Siakkou H.; Gras-Masse H.; Drobecq H.; Tartar A. (1989) Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *El Silver, Virology*. 169(1): 34-41.
- 133) Prescott J.F. (1993). Leptospirosis. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (Eds.) *Pathology of domestic animals*. 4a ed. California, Academic Press. p. 503-511.
- 134) Puentes R.; De Brun M.L.; Algorta A; Alvarez J.P.; 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*. 4(3):294-309.
- 135) Puentes R.; De Brun M.L.; Algorta A.; Da Silva V.; Mansilla F.; Sacco G.; Llambí S.; Capozzo A.V. (2016b). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res*. 12(1):119
- 136) Puentes R.; Campos F.S.; Furtado A.; Torres F.D.; Franco A.C.; Maisonnave J.; Roehe P.M. (2016c). Comparison between DNA Detection in Trigeminal Nerve Ganglia and Serology to Detect Cattle Infected with Bovine Herpesviruses Types 1 and 5. *Plos one*, 11(5): e0155941.
- 137) Pyeon D.; O'Reilly K.L.; Splitter G.A. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumorbearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J Virol*. 70(8): 5706-5710.
- 138) Quinn P.; Markey B.; Carter M.; Donnelly W.; Leonard F. (2008) Género Chlamydia y Chlamydophila. *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*, Zaragoza, Acribia, pp 241-247.
- 139) Rama G. (2009). Aspectos sobre el diagnóstico de Leucosis Enzoótica Bovina. Tesis de Grado. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Uruguay. 58 p. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1490/1/uy24-14427.pdf>. Fecha de consulta 7/12/16.
- 140) Repiso M.V.; Gil A.; Bañales P.; D' Anatro N.; Fernández L.; Guarino H.; Herrera B.; Núñez A.; Olivera M.A.; Osawa T.; Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 40:5-28.

- 141) Ridpath JF. (1996). Sequence diversity and genotyping. International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review, Cornell University, USA, pp. 39–42.
- 142) Rodak L.; Granátová M.; Veselý T.; Nevoránková Z. (1997) Monoclonal Antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p24 of enzootic bovine leucosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples. *J Vet Med B*; 44: 425-436.
- 143) Rondón I. (2006). Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología. Universidad de Córdoba Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1): 694-704.
- 144) Saizar J. (1997). Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria*: 33.(133) 3-6
- 145) Saizar J. (1998). Estudio serológico de la Diarrea Viral Bovina en rodeos de carne del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p 10
- 146) Schwartz I.; Bensaid A.; Polack B.; Perrin B.; Berthelemy M.; Levy D. (1994). In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* 68:4589-4596.
- 147) Sheldon M.; Cronin J.; Goetze L.; Donofrio G.; Schuberth A. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle *Biol Reprod.*, 81: 1025-1032.
- 148) Silva Paravis M.; Muller G.; Errico F. (1998). Validating a Bovine Brucellosis Elisa Test for Application in Uruguay. International Atomic Energy Agency (IAEA) IAEA -TEC DOC - 1055. p. 45-47
- 149) Souza F.; Blagitz M.; Latorre A.; Ramos Sánchez 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.
- 150) Stanchi N.; Martino P.; Gentilini E.; Reinoso E.; Echeverria M.; Leardini N. (2007). *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*, Editorial Intermédica, p 549.
- 151) Straub O.C. (2001): Advances in BHV-1 (IBR) research. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 108(10): 419-422
- 152) Thiermann A.B. (2004). Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of caws at slaughter. *Am. J. Vet. Res* 44: 2244-2245.
- 153) Thilsted J.P.; Dubey J.P. (1989) Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.
- 154) Timoney J.F. (2005). The spirochetes. En: Hagan & Bruner's. *Microbiology and infectious diseases of domestic animals.* 8ª ed. Comstock, Cornell University Press p. 45-57.

- 155) Uzal F.A.; Abalos P.; Padilla F.; Rojas X.; Dajer A.; Silva Paravis M.; Nielsen K.H.; Wright P.F. (1995). Evaluation of an indirect ELISA Kit for the Diagnosis of Bovine Brucellosis in Latin America. Arch Med Vet. 27(N° extr):59-63.
- 156) VanLeeuwen J.A.; Haddad J.P.; Dohoo I.R.; Keefe G.P.; Tiwari A.; Tremblay R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairycows. Prev. Vet. Med. 94:54-64.
- 157) Verna A.E.; Leunda M.R.; Louge Uriarte E.L.; Pereyra S.B.; Marín M.S.; González Altamiranda E.; Pérez S.E.; Odeón A.C. (2008) Herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4), un nuevo agente asociado a problemas reproductivos del ganado bovino en Argentina. Laboratorio de Virología, Grupo de Sanidad Animal, INTA, CC 276(7620), Balcarce. XVII Reunión científico-técnica de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario.
- 158) Villegas V. (2015). Leucosis Bovina Enzoótica. Tesis de grado. Universidad de La Salle Facultad de ciencias agropecuarias. Med Vet. Colombia 2015. Disponible en <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/17577>. Fecha consulta: 22/11/16.
- 159) Zaffaroni R.; Piaggio J.; Núñez A.; de Freitas J.; Suanes A.; Cernicchiaro N.; Gil A. (2007). Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica en la cuenca lechera sur del Uruguay. V Jornadas Técnicas Veterinarias, Uruguay. P. 150-151.
- 160) Zimmermann W.; Broll H.; Ehlers B.; Buhk H.; Rosenthal A.; Goltz M. (2001) Genome sequence of bovine herpesvirus-4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication J Virol., 75: 1186-1194.

