



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Estudio de la prevalencia de neosporosis y Diarrea Viral Bovina en tambos de la provincia de Salta y análisis de la factibilidad de control de la Diarrea Viral Bovina mediante vacunación

Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Méd. Vet. Rodrigo Pereyra

Directora de tesis: Dra. Alejandra Capozzo

Área de sanidad animal IIACS INTA Cerrillos Salta

Instituto de Virología CICVyA INTA Castelar

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “Estudio de la prevalencia de neosporosis y Diarrea Viral Bovina en tambos de la provincia de Salta y análisis de la factibilidad de control de la Diarrea Viral Bovina mediante vacunación” fue realizado en el Área de Sanidad Animal IIACS, INTA Cerrillos, Salta, y el Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, bajo la Dirección de la Dra. Alejandra Victoria Capozzo.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados

- *Seroprevalence and risk factors associated with Neospora caninum in dairy farms from the Province of Salta, Argentina.* Walter Rodrigo Pereyra, Víctor Humberto Suárez, Nancy Cardoso, Ignacio Gual, Gabriela Marcela Martínez, Alejandra Victoria Capozzo, Florencia Celeste Mansilla. Rev Argent Microbiol. 2020 Sep 11; S0325-7541(20)30065-1. doi: 10.1016/j.ram.2020.06.011.
- *Evidence of reduced vertical transmission of Neospora caninum associated with higher IgG1 than IgG2 serum levels and presence of IFN- γ in non-aborting chronically infected cattle under natural condition.* Rodrigo Pereyra, Florencia Celeste Mansilla, Marcos Ivan Petersen, Victor Suarez, Alejandra Victoria Capozzo. Vet Immunol Immunopathol. 2019 feb; 208:53-57. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.01.001. Epub 2019 Jan 8.

Trabajos en preparación

- *Primer reporte de una experiencia de control a campo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) en Argentina aplicando herramientas de manejo, diagnóstico y vacunación.* Rodrigo Pereyra, Fernando Martino, Claudio Paolazzi, Juan Sala, Alejandra Capozzo (Revista Argentina de Microbiología).

Agradecimientos

La culminación de esta tesis doctoral ha sido un viaje emocionante y enriquecedor, y me gustaría aprovechar esta oportunidad para expresar mi gratitud a todas las personas que han sido parte fundamental de este logro.

En primer lugar, quiero extender mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Alejandra Capozzo. Su liderazgo, experiencia y dedicación han sido invaluable a lo largo de este proceso. Siempre estuvo dispuesta a escucharme, guiarme y brindarme valiosos consejos que contribuyeron de manera significativa a la calidad de esta investigación.

Agradezco de manera especial a los distinguidos miembros de mi comité de tesis. Sus comentarios perspicaces, críticas constructivas y sugerencias profundizaron mi comprensión del tema y me impulsaron a superar mis propios límites académicos.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis colegas y amigos tanto del Laboratorio de Sanidad Animal como del Laboratorio Agropharma, así como al Vet. Fernando Martino, por su incondicional apoyo y colaboración. También agradezco a mis compañeros del Instituto de Virología de INTA Castelar y al personal de los tambos bovinos. El compartir conocimientos y experiencias con ustedes ha sido un privilegio. Sus amistades y apoyo mutuo fueron un pilar fundamental en esta tesis.

Mi familia merece un reconocimiento especial. A Liza, mi compañera de vida en este camino, un pilar fundamental, por su apoyo incondicional en cada viaje que he realizado y en todas las actividades llevadas a cabo durante estos años. A Milagros, mi pequeña, mi motor en la vida. Sin ustedes, este logro no habría sido posible

A mis padres, Walter y Lidia, con su ejemplo de vida, me enseñaron que con perseverancia se pueden alcanzar las metas propuestas. A mis hermanos, Pablo y Rocío, por su apoyo incondicional y amor.

Quiero agradecer también a las instituciones públicas, CONICET y la Agencia Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación por su generoso respaldo financiero. Su apoyo fue esencial para llevar a cabo esta investigación y hacer realidad este proyecto.

Quiero brindar mi más sincero agradecimiento a todos los animales que formaron parte de esta tesis.

Dedico este trabajo de tesis doctoral a Liza y Mili (Las amo).

Índice

| | |
|--|--------------------------------------|
| RESUMEN..... | 10 |
| Listado de Abreviaturas | 16 |
| INTRODUCCION..... | 18 |
| Generalidades..... | 18 |
| <i>Neospora caninum</i> | 21 |
| Distribución mundial | 21 |
| Neosporosis en Argentina | 22 |
| Pérdida por neosporosis e importancia económica | 22 |
| Protozoo del phylum Apicomplexa | 23 |
| Taxonomía..... | 23 |
| Ciclo de vida | 24 |
| Cepas y virulencia | 28 |
| Neosporosis Bovina..... | 30 |
| Sintomatología clínica..... | 32 |
| Patogenia del aborto | 32 |
| Interacción parásito y hospedador..... | 33 |
| Respuesta inmune protectora | 39 |
| Regulación del sistema inmune durante la preñez | 33 |
| Factores de riesgo..... | 36 |
| Vacunas en el mercado | 37 |
| Diagnóstico..... | 39 |
| Serología e histopatología: Técnicas y alcances | 41 |
| Detección de Genoma de <i>N. caninum</i>..... | 44 |
| Diarrea Viral Bovina..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Introducción y breve historia de la enfermedad..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| Etiología | 46 |
| Estructura viral | 47 |
| Proteínas virales | 49 |
| Proteínas estructurales | 49 |
| Proteínas no estructurales | 49 |
| Replicación viral | 49 |
| Diversidad viral | 50 |
| Genotipos virales | 51 |
| Biotipos virales | 52 |
| Respuesta inmune frente a VDVB | 53 |
| Inmunidad innata | 53 |
| Inmunidad Celular | 54 |
| Inmunidad humoral | 54 |
| El sistema inmune de los terneros neonatos | 55 |
| Presentación de la enfermedad infecciosa | 55 |
| Modo de transmisión | 56 |
| Infección Aguda | 56 |
| Infección Congénita | 56 |
| Infección Persistente | 57 |
| Enfermedad de las mucosas | 57 |
| Síndrome hemorrágico | 58 |
| Epidemiología | 58 |
| Distribución mundial y en la Argentina | 58 |
| Impacto económico (industria ganadera y biológicos) | 60 |
| Diagnóstico | 62 |
| Detección viral | 62 |
| Detección genoma del VDVB | 64 |
| Detección anticuerpos VDVB | 65 |
| Vacunas contra el VDVB | 67 |

| | |
|--|-----------|
| Modelos de erradicación de VDVB | 69 |
| Modelo de erradicación de VDVB sin vacunación | 70 |
| Modelo de erradicación con vacunación | 70 |
| Hipótesis | 74 |
| Objetivo general | 74 |
| MATERIALES Y METODOS GENERALES | 75 |
| Animales | 75 |
| Virus | 75 |
| Parásitos (Taquizoítos) | 75 |
| Células | 75 |
| Obtención de muestras | 76 |
| Bovinos | 76 |
| Suero | 76 |
| Biopsia post mortem | 76 |
| Biopsia epitelio auricular | 76 |
| Sueros caninos | 76 |
| Encuesta epidemiológica en la CVLSa | 77 |
| Tamaño de la muestra en la CVLSa | 77 |
| Técnicas serológicas | 77 |
| ELISA para determinacion de anticuerpos anti <i>N. caninum</i> | 77 |
| ELISA Isotipos anti <i>N. caninum</i> | 78 |
| ELISA Interferón-γ | 79 |
| Determinacion de anticuerpos anti VDVB | 79 |
| ELISA para detección de anticuerpos contra la proteína no estructural NS3 | 79 |
| ELISA para detección de antígenos virales del VDVB | 79 |
| Page-Western Blot para detección de anticuerpos anti VDVB | 80 |
| Detección de genoma de <i>N. caninum</i> | 80 |
| Detección genoma virus de la diarrea viral bovina | 81 |
| Análisis de secuencias para VDVB | 82 |

| | |
|---|------------|
| Titulación viral | 83 |
| Vacuna Experimental | 83 |
| Seroneutralización viral | 83 |
| Análisis estadístico | 84 |
| CAPITULO 1 | 85 |
| ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGIA DE NEOSPOROSIS EN LA CUENCA LECHERA DEL VALLE DE LERMA EN LA PROVINCIA DE SALTA | 85 |
| Objetivo | 85 |
| Materiales y métodos específicos | 85 |
| Toma de muestra y encuesta epidemiológica | 85 |
| Análisis estadístico | 85 |
| Resultados | 86 |
| Sistemas productivos | 86 |
| Análisis serológico de muestras bovinas provenientes de diferentes tambos | 88 |
| Identificación de animales con Infecciones crónicas vs agudas | 91 |
| Detección genoma <i>N. caninum</i>..... | 92 |
| Discusión | 93 |
| Conclusión..... | 95 |
| CAPITULO 2 | 96 |
| PERFIL DE RESPUESTA INMUNE DE VACAS PRE-PARTO Y TERNEROS PRIVADOS DE CALOSTRO: EVIDENCIA DE REDUCIDA TRANSMISION VERTICAL DE <i>N. CANINUM</i> ASOCIADOS A ELEVADOS NIVELES SERICOS DE IgG1 QUE IgG2 Y PRESENCIA DE INF-γ EN VACAS INFECTADAS QUE NO ABORTARON | 96 |
| Objetivos | 96 |
| Materiales y métodos específicos | 96 |
| Toma de muestra | 96 |
| Análisis estadístico | 97 |
| Resultados | 98 |
| Discusión | 102 |
| Conclusión..... | 103 |

| | |
|---|------------|
| CAPITULO 3 | 104 |
| ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN LA CUENCA LECHERA DEL VALLE DE LERMA DE LA PROVINCIA DE SALTA | 104 |
| Objetivo | 104 |
| Materiales y métodos específicos | 104 |
| Toma de muestra y Encuesta epidemiológica..... | 104 |
| Análisis estadístico | 104 |
| Resultados | 104 |
| Sistemas productivos y seroprevalencia..... | 104 |
| Análisis serológico de muestras bovinas provenientes de diferentes tambos | 105 |
| Identificación de bovinos persistentemente infectados | 106 |
| Análisis de secuencias obtenidas de muestras positivas a VDVB | 108 |
| Presencia de bovinos infectados con <i>N. caninum</i> y VDVB (coinfecciones) | 109 |
| Discusión | 109 |
| Conclusión..... | 111 |
| CAPITULO 4 | 112 |
| EXPERIENCIA DE CONTROL DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) BASADO EN EL DIAGNÓSTICO Y LA VACUNACIÓN EN UN TAMBO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE, ARGENTINA | 112 |
| Objetivos | 112 |
| Materiales y métodos específicos | 112 |
| Diseño experimental y trabajo a campo..... | 112 |
| Evaluación del estado serológico del rodeo e identificación de bovinos PI..... | 113 |
| Resultados | 114 |
| Diagnóstico de la infección viral | 114 |
| Aplicación de medidas de control | 115 |
| Discusión | 117 |
| Conclusión..... | 119 |
| DISCUSION FINAL | 120 |

| | |
|---------------------------|------------|
| CONCLUSIONES | 124 |
| BIBLIOGRAFIA | 125 |

RESUMEN

Los principales patógenos que ocasionan las mayores pérdidas reproductivas a nivel mundial y en nuestro país son el parásito protozoario *Neospora caninum* (phylum Apicomplexa) y el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB, género Pestivirus, familia Flaviviridae).

Neospora caninum (*N. caninum*) es un agente causal de abortos bovinos y mortalidad neonatal en todo el mundo. Este parásito tiene una amplia gama de huéspedes intermedios (como el bovino) y su ciclo sexual ocurre exclusivamente en cánidos. En los bovinos la transmisión puede ser vertical u horizontal. La transmisión vertical se produce tanto en bovinos infectados de forma aguda como crónica. Hay poca información sobre la respuesta inmune necesaria para prevenir la transmisión transplacentaria endógena, particularmente del ganado infectado crónicamente a su descendencia en un ambiente natural.

El VDVB es un flavivirus del género pestivirus, que causa una gran variedad de síntomas en los bovinos con una patogenia compleja. Las infecciones por el VDVB provocan grandes pérdidas económicas por una variedad de manifestaciones clínicas como aborto, nacimiento de animales con malformaciones, inmunosupresión etc. y es objeto de una serie de planes de mitigación y erradicación en todo el mundo. La infección de la madre durante la gestación puede provocar la muerte embrionaria, efectos teratogénicos o el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI). Los animales PI eliminan VDVB en sus excreciones y secreciones a lo largo de su vida y son la ruta principal de transmisión del virus. Se han utilizado diferentes herramientas de control que, en zonas de alta prevalencia, incluyen el uso de vacunas y la segregación de animales PI.

Si bien existe información sobre la epidemiología de estos dos patógenos en algunas zonas de nuestro país, nunca se estudió la cuenca lechera del Valle de Lerma de la Provincia de Salta (CVLSa). Esta es la región de mayor producción de leche bovina del NOA (noroeste argentino). Entre los años 2003 y 2011 el stock nacional disminuyó un 22%, pero en Salta aumentó un 79%. A fin de conocer el estado de situación de la neosporosis y del VDVB en la CVLSa, se diseñó un muestreo que incluyó la evaluación de muestras de suero de 40 bovinos por tambo en 16 tambos, y la determinación anticuerpos séricos contra *N. caninum* en los perros allí presentes. El análisis serológico para *N. caninum*, consistió en el uso de un ELISA indirecto desarrollado en nuestro laboratorio para medir IgG total específica y su avidéz. Se realizó RT-PCR anidada en muestras de fetos abortados. Los sueros caninos se analizaron por inmunofluorescencia indirecta. Para el diagnóstico del VDVB se utilizó ELISA comercial indirecto para medir

anticuerpos contra la proteína no-estructural NS3. Los resultados fueron confirmados por Western Blot. Se aplicó una RT-PCR anidada para identificación de bovinos PI.

N. caninum presentó una seroprevalencia alta a nivel rodeo. El 43,7% de los tambos de la CVLSa presentaron seroprevalencias superiores al 40%. Todos los tambos tenían animales con serología positiva. Se encontró una asociación positiva entre la seroprevalencia y la presencia de infecciones agudas, además se detectó al menos un perro seropositivo en los tambos analizados (6/16). El 50% de los establecimientos presentaron seroprevalencias mayores al 70% para el VDVB, mientras que el 81,2% de los establecimientos presentó al menos 1 animal con infección persistente. A partir de aislamientos realizados en bovinos PI, se identificó alta homología (>85%) con el genotipo VDVB-1b. Fue notable la asociación entre el tipo de servicio que combina inseminación artificial y "repasso con toros" (monta) y el porcentaje de abortos ($p < 0,01$). Esta tesis constituye el primer reporte sobre la circulación de *N. caninum* y VDVB en la CVLSa.

Nuestro estudio profundizó además sobre el perfil de respuesta inmune a *N. caninum*. Se estudiaron madres seropositivas no abortantes con infección crónica en 3 tambos. Se tomaron muestras de suero de 75 vacas y vaquillonas preñadas por tambo junto a sus terneros privados de calostro. Se aplicaron diferentes ELISAs para medir IgM, IgG1, IgG2 e IFN- γ , además de analizar la presencia del virus de la leucosis bovina y VDVB. Las vacas con infección crónica y que no abortan presentaron títulos más altos de anticuerpos anti-*N. caninum* IgG1 que IgG2 y presencia de IFN- γ ($p < 0,001$), mientras que el perfil opuesto se relacionó con la transmisión vertical. Estos resultados permiten mejorar la caracterización inmunológica cuando se realizan estudios de prevalencia.

Por otra parte, realizamos una prueba concepto acerca de la posibilidad de controlar las infecciones por el VDVB en condiciones de campo con alta seroprevalencia en nuestro país, combinando un procedimiento basado en diagnóstico y vacunación. Se seleccionaron dos tambos con un total de 1220 bovinos (749 para el tambo 1, 309 para el tambo 2 y 90 terneros), con una seroprevalencia a VDVB superior al 60% con presencia de bovinos PI (mayor al 2%). Se utilizó una vacuna combinada inactivada comercial que contenía cepa 1a Singer "Complex Intensivo", y la eficacia vacunal se determinó por seroneutralización viral. En este estudio se estableció un orden cronológico de intervención consistente en: a) muestreo a todos los bovinos, b) análisis serológico y detección del genoma viral para identificación de bovinos PI, c) re-muestreo para confirmar y segregar a los animales PI, d) Vacunación contra VDVB con una segunda dosis a los 21 días, e) vacunación al año y seguimiento virológico e inmunológico.

Los títulos seroneutralizantes inducidos por vacunación se incrementaron significativamente ($p < 0,05$) en todos los animales evaluados entre los 0 y los 90 días post vacunación. Además, se verificó una disminución en el porcentaje de abortos y aumento

en la tasa de concepción post-inseminación (año 2019 al 2021). Estos establecimientos no presentaron circulación de VDVB ni animales PI durante los siguientes 2 años.

Este es el primer trabajo que evaluó métodos de control de la DVB combinando vacunación y diagnóstico realizado en Argentina. Hemos demostrado además que un perfil inmunológico que combina una relación de anticuerpos anti-*N. caninum* IgG1/IgG2 > 1 con altos niveles sistémicos de IFN- γ se asocia con un menor riesgo de infección transplacentaria en vacas con infección crónica, brindando una nueva posibilidad de estudiar riesgo de transmisión vertical a campo con una herramienta sencilla de ELISA de dilución única que requiere de 10ul de suero; primordial cuando se trabaja en ensayos de campo. Demostramos también por primera vez en Argentina y en condiciones de campo, que es posible controlar las infecciones causadas por el VDVB no solamente con manejo sino además utilizando en forma coordinada las herramientas diagnósticas disponibles actualmente y una vacuna comercial.

Palabras clave: Neosporosis, Diarrea Viral Bovina, tambos bovinos provincia de Salta, vacunación.

ABSTRACT

The main pathogens causing the greatest reproductive losses worldwide and in our country are the protozoan parasite *N. caninum* (phylum *Apicomplexa*) and the bovine viral diarrhoea virus (BVDV, genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*).

N. caninum is a causative agent of bovine abortions and neonatal mortality worldwide. This parasite has a wide range of intermediate hosts (such as cattle), and its sexual cycle occurs exclusively in canines. In cattle, transmission can be vertical or horizontal. Vertical transmission occurs in both acutely and chronically infected cattle. There is little information about the immune response required to prevent endogenous transplacental transmission, particularly from chronically infected cattle to their offspring in a natural environment. BVDV can cause a variety of symptoms in cattle with complex pathogenicity. Maternal infection during gestation results in fetal infection, which can lead to embryonic death, teratogenic effects, or the birth of persistently infected calves (PI). PI animals shed BVDV in their excretions and secretions throughout their lives and are the main route of virus transmission. BVDV infections cause significant economic losses due to various clinical manifestations such as abortion, birth of animals with malformations, immunosuppression, etc., and are the subject of several mitigation and eradication plans worldwide. Different control measures have been used, including segregation of PI animals and vaccination in high prevalence areas.

While there is information about the epidemiology of these two pathogens in some areas of our country, the dairy basin of the Lerma Valley in the Province of Salta (CVLSa) has never been studied. This region is the largest producer of bovine milk in the Northwest of Argentina (NOA). Between 2003 and 2011, the national cattle stock decreased by 22%, but in Salta, it increased by 79%. To assess the current status of neosporosis and BVDV in the CVLSa, a surveillance was designed comprising the evaluation of serum samples from 40 cattle per farm in 16 farms, and the determination of serum antibodies against *N. caninum* in the dogs that were in those farms. For the serological analysis for *N. caninum* an indirect ELISA developed in our laboratory "Ya neospora" was used and subsequently, the same ELISA with an urea washing step was employed to determine antibody avidity and discriminate chronic from acute infections. Nested PCR was performed on samples from aborted fetuses. Canine sera were analyzed by indirect immunofluorescence. For the diagnosis of BVDV, a commercial indirect ELISA was used to measure antibodies against the non-structural protein NS3. The results were confirmed by Western Blot. A nested RT-PCR was applied for the identification of persistently infected (PI) cattle.

The epidemiological study of *N. caninum* and BVDV in the Lerma Valley of Salta (CVLSa) showed that antibodies against *N. caninum* were found in all farms. The

seroprevalence at the herd level: 43.7% of the farms had seroprevalences higher than 40%. A positive association was found between seroprevalence and the presence of acute infections. Moreover, at least one seropositive dog was detected in each of the analyzed farms (6/16). BVDV also showed a high seroprevalence, 50% of the establishments had values greater than 70% for while 81.2% of the establishments had at least 1 animal with persistent infection. From isolates obtained from PI cattle, a high homology (>85%) with the genotype BVDV-1b was identified. The association between the type of service using bulls and the percentage of abortions was significant ($p < 0.01$).

This thesis represents the first report on the circulation of *N. caninum* and BVDV in the CVLSa.

Additionally, our study delved into the immune response profile to *N. caninum*. Non-aborting seropositive mothers with chronic infection were studied in 3 farms. Serum samples were collected from 75 pregnant cows and heifers, along with their colostrum-deprived calves. Different ELISAs (IgM, IgG1, IgG2, IFN- γ) were applied, along with the analysis of the presence of bovine leukemia virus and BVDV. Cows with chronic infection and no abortion showed higher titers of anti- *N. caninum* IgG1 antibodies than IgG2 and the presence of IFN- γ ($p < 0.001$), whereas the opposite profile was related to vertical transmission. These results allow for an improved immunological characterization when conducting prevalence studies.

A field trial for the control of BVDV infections based on diagnosis and vaccination was carried out, due to the high prevalence found, as proof-of-concept. Two farms with a total of 1220 cattle (749 for farm 1, 309 for farm 2, and 90 calves) were selected. The seroprevalence to BVDV was above 60% and the presence of PI cattle was higher than 2%. Serology was determined using commercial kits, while the presence of PI cattle was detected by an in-house nested RT-PCR and using a commercial ELISA that detects NS3 antigen. An inactivated combined commercial vaccine containing the BVDV 1a-Strain Singer "Complex Intensivo" was used, and vaccine-induced immunity was determined by viral seroneutralization using the vaccine strain. The study established a chronological order of activities consisting of a) sampling all cattle (sera), b) serological analysis and detection of viral genome for identification of PI cattle, c) re-sampling for confirmation and segregation of PI cattle, d) vaccination against BVDV with a second dose after 21 days, e) annual vaccination and diagnostics.

The seroneutralizing titers induced by vaccination increased significantly ($p < 0.05$) in all evaluated animals between 0- and 90-days post-vaccination. Additionally, there was a decrease in the percentage of abortions (from 2019 to 2021) and an increase in the conception rate. These farms did not have BVDV circulation or PI animals during the following 2 years.

This is the first work that identified the impact of BVDV and *N. caninum* infections in the CVLSa. Overall, our results suggest that an immunological profile combining an *N. caninum* IgG1/IgG2 antibody ratio >1 with high systemic levels of IFN- γ is associated with a lower risk of transplacental infection in cows with chronic infection. It is essential to consider that these immunological parameters can be easily evaluated by conducting ELISAs with field samples, which is crucial when working in field trials. We also demonstrated for the first time in Argentina and under field conditions, that it is possible to control infections caused by BVDV using currently available diagnostic tools and a commercial vaccine.

Keywords: Neosporosis, Bovine Viral Diarrhea, Dairy farms in the province of Salta, Vaccination.

Listado de Abreviaturas

Ac: Anticuerpos

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BLV: Virus leucosis bovina

BRSV: Virus Sincitial Respiratorio Bovino

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus

CVLSa: Cuenca lechera del Valle de Lerma de la Provincia de Salta

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CP: Citopático o citopatogénico

CPA: Células presentadoras de antígenos

CRB: Complejo Respiratorio Bovino

DIVA: Diferenciación entre animales vacunados de los infectados naturalmente

DPV: Días post vacunación

DVB: Diarrea Viral Bovina

EF: Enfermedad de las fronteras

EM: Enfermedad de las mucosas

GAGs: Glicosaminoglicanos

IA: Índice de Aidez

IBR: Virus de la rinitis infecciosa bovina

IFAT: Inmunofluorescencia indirecta

IFN: Interferón

IFN- γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IHQ: Inmunohistoquímica

IMC: Respuesta inmune mediada por células

IRES: Sitio de entrada ribosomal interno

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MDBK: Madin-Derby Bovine kidney

MHC-II Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2

MICs: Proteínas secretadas por micronemas

MLV: Virus vivo atenuado

N. caninum: *Neospora caninum*

NAT: Prueba de aglutinación

NCP: No citopático o no citopatogénico

NcPro: Profilina de *Neospora caninum*

NJ: árbol filogenético Neighbor-Joining

NKs: Células natural killer

NOA: Noroeste argentino

NV o SN: Neutralización viral o seroneutralización

PBS: Buffer fosfato salino

PCR-NESTED: Reacción en cadena de la Polimerasa Anidada

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PI: Persistentemente Infectados

PI-3: Virus de la parainfluenza tipo 3

RT nested- PCR: Retro transcripción de la PCR anidada

S. cruzi: Sarcocystis cruzi

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

T. Gondii: Toxoplasma gondii

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VDVB: Virus Diarrea Viral Bovina

VP: Vesícula parasitófora

VPPC: Peste porcina clásica

INTRODUCCION

Generalidades

El noroeste argentino (NOA) es una de las seis regiones agroecológicas de la Argentina, caracterizada por un clima subtropical con estación seca, que comprende una gran diversidad de ambientes. Está formado por las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero y Catamarca. La producción bovina se ha ido desplazando a las regiones extra pampeanas, debido a cambios en la agricultura y sistemas de explotación. El NOA es la región donde la ganadería estaría mostrando un mayor crecimiento. Esta expansión se debería principalmente a la incorporación de sistemas silvopastoriles y de la implantación de pasturas de gran rendimiento forrajero. La ganadería en el NOA se ha incrementado, principalmente, debido a la expansión de monocultivos en el centro del país (Censo Nacional Agropecuario 2018). En marzo de 2016, en la provincia de Salta, la existencia bovina era de 1.173.815 cabezas. La actividad tambera se desarrolla fundamentalmente en el Valle de Lerma. El Valle se encuentra ubicado entre los paralelos 24° 30' y 25° 37' de latitud sur y los meridianos 65° 22° y 65° 40' Oeste, lo que representa un área total de 17.000 Km² de extensión, albergando a los departamentos de La Caldera, Capital, Rosario de Lerma, Cerrillos, Chicoana, La Viña y parte de Gral. Güemes. Del total de la población en la provincia de Salta (1.215.207 habitantes), esta región concentra alrededor del 50% (Censo 2010). El Valle de Lerma se encuentra situado entre las inmediaciones de la precordillera de los Andes al oeste y las sierras subandinas al este, a una altura media que varía entre los 1.100 y 1.450 msnm (metros sobre el nivel del mar) con precipitaciones que van de más de los 1.000 mm en las serranías y piedemonte al norte y oeste del valle, a menos de 400 mm al sur y este del mismo. En los meses de noviembre a abril se destaca por la explotación intensiva de la tierra. Si bien el promedio anual de precipitaciones es de 900 mm, se destacan dos períodos bien definidos: uno lluvioso que abarca desde finales de noviembre a mediados de abril y otro seco que comprende los meses de mayo a noviembre, caracterizado este último por escasas o nulas precipitaciones. En el mencionado periodo, la utilización de agua de riego se vuelve un factor clave en los sistemas productivos para compensar las deficiencias de agua en la época invierno-primavera. La temperatura promedio del Valle es de 16,7°C (INTA Salta), durante el período estival (principalmente noviembre) se presentan los máximos registros de temperatura media mensual; en tanto que, los valores medios mínimos se destacan durante los meses invernales de junio y/o julio. La cuenca lechera ubicada dentro del Valle de Lerma (CVLSa) presenta una producción predominante de tipo pastoril con altos niveles de suplementación de alimentos concentrados y voluminosos. Dentro de la producción de leche bovina, existen explotaciones grandes confinadas (dry lots y free stall) y otras más

pequeñas con producción bovina mayormente a pastoreo (Pastoreo a campo con Suplementación). La base genética es Holando con una producción promedio por vaca por día de $21,5 \pm 5,3$ litros de leche. La cuenca del Valle de Lerma de la provincia de Salta (CVLSa) cuenta con la presencia de 31 tambos y una producción de más de 102.500 litros de leche por día, con un número aproximado de 7000 cabezas, un promedio 280 vacas en ordeño por establecimiento, lo que representaría a 152 vacas y 71 vaquillonas en promedio [358] y que abastece aproximadamente al 25 % de la población de Salta

Entre los años 2003 y 2011, el stock nacional disminuyó un 22%, pero el salteño aumentó un 79%, en Rosario de Lerma creció un 54%. Esta región representaría la de mayor potencial de crecimiento del stock cuando se la compara con el resto de los territorios extra-pampeanos.

Los dos patógenos que ocasionan las mayores pérdidas reproductivas a nivel mundial y en nuestro país son el parásito *Neospora caninum* (*N. caninum*) y virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) [56, 258].

La neosporosis bovina, causada por el protozoo *N. caninum*, está ampliamente difundida en regiones ganaderas de todo el mundo [258]. Este protozoo del phylum *Apicomplexa* tiene como hospedador definitivo a los cánidos y zorros [258] siendo hospedadores intermediarios los bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, ciervos y equinos. Las pérdidas económicas de los rodeos de leche de Argentina han sido estimadas en unos \$80 millones por año debido al incremento del intervalo parto-concepción, muerte perinatal o neonatal, incremento en el descarte de vacas debido a fallas reproductivas, reducida producción de leche debida al intervalo entre partos y pérdidas económicas ocasionadas por el mantenimiento de la infección en el rodeo [258].

La principal vía de contagio en bovinos es vertical (transplacentaria) [114]. En Argentina, el comportamiento epidemiológico de la enfermedad podría tener algunas diferencias en nuestros rodeos para carne y leche debido al diferente tipo de manejo existente y basados en estudios realizados en otros países [311]. En otras regiones del mundo, se han descrito ciertos factores de riesgo asociados a la intensificación de los sistemas de producción [120]. Con las condiciones actuales de explotación del noroeste de nuestro país, dichos factores podrían determinar un comportamiento disímil de la enfermedad en los rodeos locales existiendo mayor cantidad de animales seropositivos en rodeos para leche. Es importante además considerar el rol de los cánidos domésticos y silvestres, como el zorro [258], en la circulación de este parásito en los rodeos bovinos [248].

El VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. Es un virus envuelto con genoma de ARN de cadena simple en sentido positivo [122]. La infección por el VDVB puede ser aguda (Diarrea Viral Bovina, "DVB"), fatal (síndrome denominado "Enfermedad

de las Mucosas” EM) o causar cuadros reproductivos de infertilidad, abortos y anomalías congénitas [56, 94]. La infección de hembras preñadas entre los 40 y 120 días de gestación es de alta relevancia epidemiológica ya que el ternero puede nacer inmunotolerante a la cepa infectante y presentar una infección persistente (IP) que mantiene la circulación viral en el rodeo [180, 267].

Neospora caninum

N. caninum es un parásito intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa, donde también se encuentran otros géneros de reconocida importancia en la clínica como Plasmodium, Toxoplasma, Babesia, Eimeria o Cryptosporidium.

Por otra parte, están aquellos coccidios capaces de formar quistes que poseen tanto una forma entérica como una forma tisular, típicamente relacionada con la fase crónica de la infección [104]. Entre ellos, *Toxoplasma gondii* es el de mayor distribución mundial, es un patógeno oportunista capaz de infectar cualquier tipo de célula nucleada en cualquier vertebrado homeotermo. Toxoplasma se convirtió en el organismo modelo del phylum debido a que es de fácil manipulación y actualmente se disponen de excelentes herramientas genéticas y modelos animales [334].

La primera identificación de *N. caninum* fue en 1984 [49], quienes describen un síndrome en perros jóvenes caracterizado por encefalomiелitis y miositis producido por un parásito muy semejante a *Toxoplasma gondii*. Luego, en 1988, se propuso un nuevo género al identificar un protozoo en perros con síntomas neuromusculares, al que denominaron Neospora, con dos especies caracterizadas hasta el momento: *N. caninum* y *Neospora hughesi* [109]. Tras conseguir aislar dicho agente en cultivo celular y reproducir la infección experimentalmente en el perro, sumado al desarrollo de pruebas diagnósticas como inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos e inmunohistoquímica para determinar la presencia del parásito en tejidos de animales infectados [50] se logró demostrar que el parásito identificado en 1984 se trataba de *N. caninum*.

Distribución mundial

N. caninum es un parásito distribuido a nivel mundial. Se han reportado infecciones en diversos continentes como ser Europa, Asia, América, precisamente en países como Australia, Nueva Zelanda, Corea, Japón, Tailandia, República Checa, Egipto y Estados Unidos, entre otros. Se han visto casos de abortos y mortalidad neonatal en bovinos asociados a neosporosis en Argentina, Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Costa Rica, Alemania, Francia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Corea, Méjico, Holanda, Nueva Zelanda, Polonia, Portugal, España, Sudáfrica, Suecia, Inglaterra, Estados Unidos y Zimbabue [120]. Estudios cuantitativos en Estados Unidos y Holanda indican que entre un 12-42% de los fetos abortados en ganado lechero estaban infectados con *N. caninum* [13, 389].

La seroprevalencia puede variar dependiendo del país, región, tipo de técnica serológica empleada para el diagnóstico, tipo de producción bovina, número de animales evaluados y el punto de cohorte.

Neosporosis en Argentina

No se conoce con exactitud la prevalencia de *N. caninum* en Argentina. Las causas de aborto son desconocidas en el 50% de los casos, y en general no se dispone de información sobre la respuesta humoral de los fetos abortados frente a los diferentes patógenos que producen aborto en el ganado bovino. En un estudio realizado en la provincia de La Pampa, se evaluaron líquidos de 95 fetos abortados de rodeos lecheros y de carne, se detectaron anticuerpos específicos en 7% en rodeo de carne y 20,3% para el ganado lechero [135]. En la provincia de Corrientes se determinó que 15 de 305 (4,9%) toros de la industria de la carne eran seropositivos para *N. caninum* por IFAT, aunque el rol de los toros en la neosporosis bovina y el riesgo de transmisión horizontal no se conoce con exactitud [259].

Se ha reportado la presencia de ADN de taquizoítos en muestras de semen de toros infectados experimentalmente, pero no se ha podido demostrar la transmisión venérea de la enfermedad [81, 132, 342]. Otro estudio, también llevado a cabo en Corrientes, reporta la presencia de anticuerpos anti-neospora en un 64% de los búfalos analizados (287/449) [77]. Se describió por primera vez la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en ovejas lecheras en la región de la Pampa húmeda, en donde el 3% de los animales que se analizaron resultaron seropositivos (21/704) [168].

Estudios de seroprevalencia realizados por INTA en las provincias de Santa Fe y Córdoba detectaron entre un 15 y 27% de bovinos lecheros positivos a *N. caninum*. En la cuenca Mar y Sierras un trabajo realizado en INTA dio a conocer una seroprevalencia del 16.1% en 416 vacas lecheras de 22 tambos. Existen datos de la provincia de Jujuy del año 2008 que indican una seroprevalencia del 17,5% en rodeos lecheros (comunicación interna). Por otra parte, en la provincia de Jujuy se reportó la presencia de llamas seropositivas (4,6% de 308 animales estudiados), el 14,5% de los campos presentó animales positivos [262]. En el año 2012 un relevamiento realizado en rodeos de cría (n=152 animales) en la provincia de Salta, arrojó una seroprevalencia del 9,2 % (comunicación interna).

En la actualidad se desconoce la prevalencia de neosporosis bovina en el NOA y en la CVLSa.

Pérdida por neosporosis e importancia económica

Las fallas en la reproducción por la infección con *N. caninum* constituyen la principal pérdida económica en diversas regiones. Además del costo por aborto, existen pérdidas

indirectas que incluyen gastos del profesional veterinario, la determinación del diagnóstico, posibles disminuciones en el rendimiento de la producción lechera, costos de reposición e incremento del intervalo parto-parto y costos del reemplazo de los animales si son sacrificados [108].

No existen en la actualidad registros claros sobre las pérdidas económicas por la neosporosis bovina. En 2016 Estados Unidos, estimaron que la neosporosis bovina produjo pérdidas de 546 millones y 111 millones de dólares por año [247]. Mientras que, en California, aproximadamente 40.000 abortos podrían deberse a *N. caninum*, generando una pérdida estimada en \$35 millones de dólares por año. En Australia y Nueva Zelanda, se cree que las pérdidas superan los \$100 millones de dólares australianos por año [309] y 9,7 millones de euros por año en Suiza [166]. En Holanda, el 76% de los rodeos con animales seropositivos no tuvieron episodios de aborto, por lo que tampoco existieron pérdidas económicas. En cambio, en el 24% de los rodeos restantes, las pérdidas económicas se incrementaron notablemente alcanzando un máximo de 2.000 euros por año. Además, en los rodeos con tormentas de abortos, los costos alcanzaron un valor promedio de 50 euros por animal durante los dos años consecutivos a los abortos, debido al sacrificio prematuro de animales, intervalos parto- parto más largos, edad de la primera parición, bajas en la producción de leche y dificultades en el diagnóstico [31]. Las pérdidas posteriores al nacimiento de los terneros infectados son difíciles de documentar ya que no hay efectos evidentes en el adulto más allá del aborto.

En Argentina, las pérdidas económicas por neosporosis en la región de la Pampa húmeda (una de las regiones productoras de ganado más importantes del mundo) se han estimado en US\$1.865 por aborto, lo que equivale a una pérdida total de US\$43.607.430 por año para la industria lechera y US\$12.903.440 para la industria de la carne en la misma región [257].

Protozoo del phylum Apicomplexa

N. caninum es un parásito intracelular obligado y su ciclo biológico es heteroxeno, afecta tanto al ganado bovino como a los cánidos (salvajes o domésticos) ya sean jóvenes o adultos. *N. caninum* fue aislado e identificado definitivamente en 1988 [109], del phylum Apicomplexa, subclase Coccidia, familia Sarcocystidae, que afecta principalmente al ganado y los caninos [155, 312]. Es causante de lesiones graves en el perro, fundamentalmente de tipo neuromuscular, y de abortos y muerte neonatal en bovinos. En 1988, se realiza la descripción de un nuevo género y especie: *N. caninum* [109, 155].

Taxonomía

Neospora es un género de parásitos protozoarios que se incluye actualmente en el *Phylum Apicomplexa*, clase Sporozoa, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidia*, suborden *Eimeriina* y familia *Sarcocystidae* [116]. En la **Tabla 1** se resumen las características morfológicas y biológicas de la familia *Sarcocystidae*.

| CLASIFICACIÓN | NOMBRE | CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS |
|---------------|---------------|--|
| Phylum | Apicomplexa | Formas invasivas con complejo apical |
| Clase | Sporozoa | Locomoción de formas invasivas mediante movimientos de flexión, ondulación y deslizamiento |
| Subclase | Coccidia | El ciclo biológico incluye merogonia, gametogonia y esporogonia |
| Orden | Eucoccidia | La merogonia tiene lugar en hospedadores vertebrados |
| Suborden | Eimeriina | Existe desarrollo independiente de gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos) |
| Familia | Sarcocystidae | Parásitos heteroxenos y formadores de quistes en el hospedador intermediario (diferentes especies de herbívoros). El hospedador definitivo (diferentes especies de carnívoros) elimina ooquistes en las heces. |

Tabla 1: Características morfológicas y biológicas de la familia *Sarcocystidae* (Reproducido de Tesis Collantes-Fernández). Fuente: Dubey, 1994.

Ciclo de vida

N. caninum, tiene un amplio espectro de hospedadores tanto domésticos como silvestres (**Fig. 1**). Su presencia se ha descrito en el perro, el ganado bovino, la cabra [24, 116], la oveja [118], el caballo [220], el búfalo de agua [158, 186], el camello [172], el gato [112, 340], el antílope [301], la liebre [129, 188], el ciervo [116, 388], el mapache [215], el coyote [219], el zorro [9, 194], el dingo [198], diversos felinos salvajes [89], el burro [230], el carpincho [367], el jabalí [33], el cerdo [34], el conejo [183], el rinoceronte [387]. La infección experimental ha sido establecida en el ratón [223], el gerbo [117], el gato [222], el perro [119], el coyote [219], el zorro [241], la vaca [15, 16, 39, 191, 229, 234, 385, 386], la oveja [72, 73, 246, 275], la cabra [216], el cerdo [195], el mono [39, 174] y en diversas especies de aves [19, 152]. El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no son del todo conocidos.

El huésped definitivo de *N. caninum* se descubrió en 1998. Se identificaron ooquistes en heces de perros a los que se les habían administrado por vía oral, cerebros de ratones infectados con el parásito [248]. Los ooquistes se eliminaban sin esporular y esporulaban

en el medio ambiente a las 24 horas [217]. Posteriormente, se confirmó la eliminación de ooquistes en perros que habían sido alimentados con tejidos que contienen quistes tisulares procedentes de ratones [218]. De esta manera, se demostró que el perro, además de ser hospedador intermediario, actuaría como el hospedador definitivo en el ciclo biológico [248].

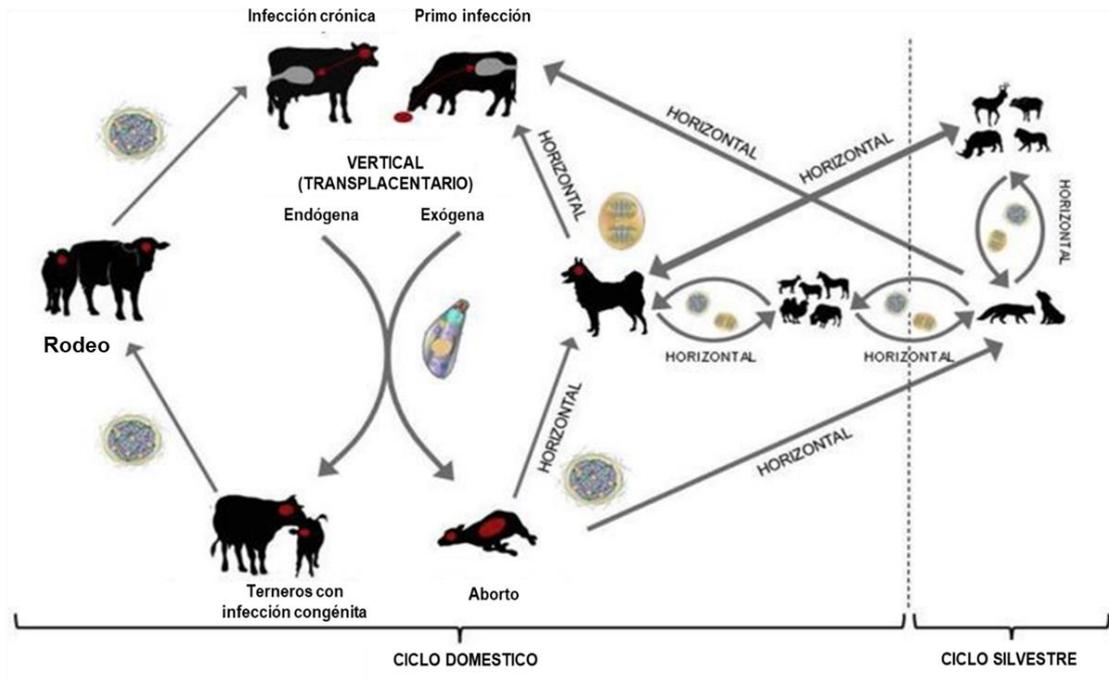


Fig. 1: Esquema del ciclo de vida de *N. caninum*, fuente: Dubey y Barr, 2002.

Los bradizoitos en el interior del quiste tisular (**Fig.2**). Conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) [221].

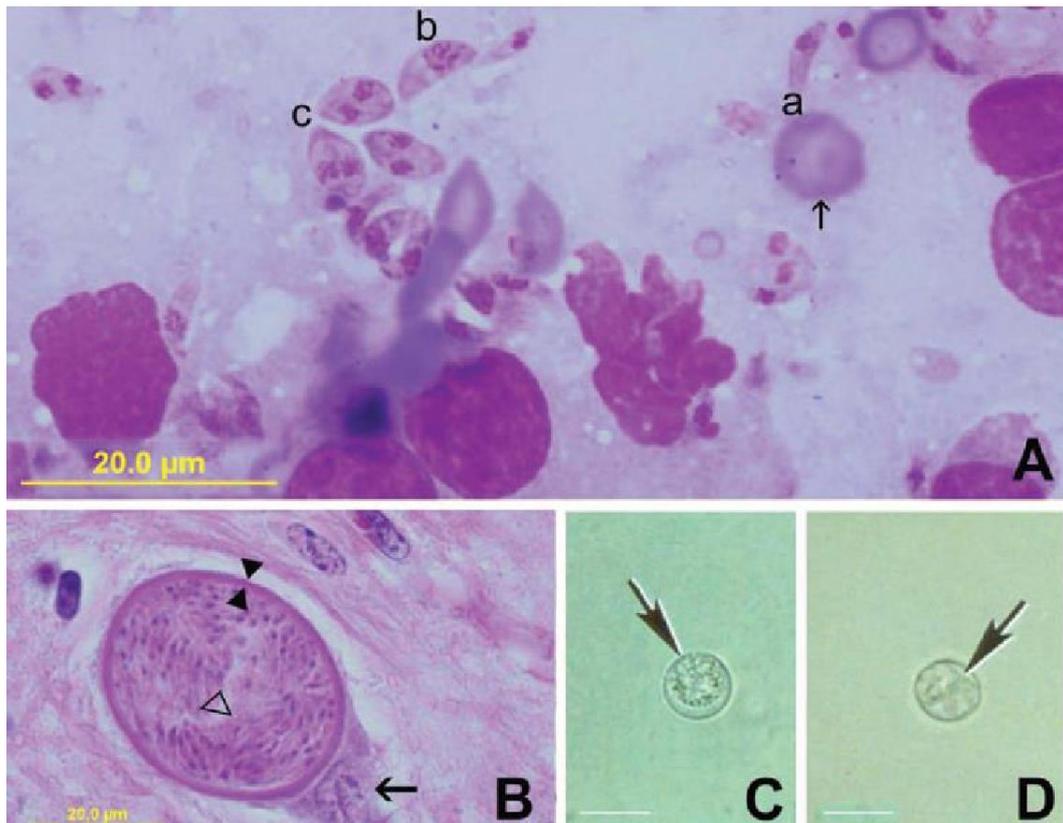


Fig. 2: Estadios del ciclo celular de *N. caninum*. Fuente: Dubey, Schares, & Ortega-Mora, 2007, (A) Sección del hígado de un ratón experimentalmente infectado conteniendo varios taquizoítos (Tinción de Giemsa). El tamaño de los taquizoítos varía según el estadio de división: **a**) taquizoíto maduro, **b**) taquizoíto antes de la división, **c**) tres taquizoítos en división. (B) Corte histológico de un quiste tisular dentro de una neurona de un ternero congénitamente infectado (Tinción de hematoxilina-eosina). (C) Ooquiste sin esporular con una masa central sin dividir en las heces de un perro (sin tinción). (D) Ooquiste esporulado con dos esporozoitos internos (sin tinción).

Este protozoario presenta en su ciclo de vida tres estadios infectivos: taquizoítos, quistes tisulares con bradizoitos en su interior y ooquistes. Tanto los taquizoítos como los quistes tisulares tienen una alta similitud morfológica con *Toxoplasma gondii* bajo el microscopio óptico [8, 207, 258].

Los taquizoítos (**Fig. 3**) se encuentran en el hospedador intermediario en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente en la vacuola parasitófora de la célula hospedadora. Puede parasitar a un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos [109, 114]. Los taquizoítos se dividen intracelularmente por endodiogénesis en forma rápida; lo que provoca la necrosis celular. Miden aproximadamente $5 \text{ a } 7 \mu\text{m} \times 1 \text{ a } 5 \mu\text{m}$, tienen entre 6-16 roptrias y en algunos casos presentaron entre 4-6 roptrias localizadas posterior al núcleo, raramente se observa un microporo. Son de forma ovoide, semilunar o globosa [348]. Los bradizoitos (**Fig. 4**) se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes tisulares. Miden aproximadamente $7\text{-}8 \mu\text{m}$, contienen las mismas organelas y son de morfología similar a los taquizoítos, pero presentan un

número menor de roprias [348]. Los quistes son un estado encontrado en el hospedador intermediario, en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 μm de diámetro, con una pared lisa y gruesa. Se encuentran primariamente en el sistema nervioso central [348]. Los ooquistes pueden encontrarse en dos formas, no esporulados y esporulados. Los no esporulados son los eliminados por los perros infectados, midiendo entre 11.7 a 11.3 μm de diámetro y los esporulados son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno [114] son morfológicamente similares a los ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia* en el perro [110].

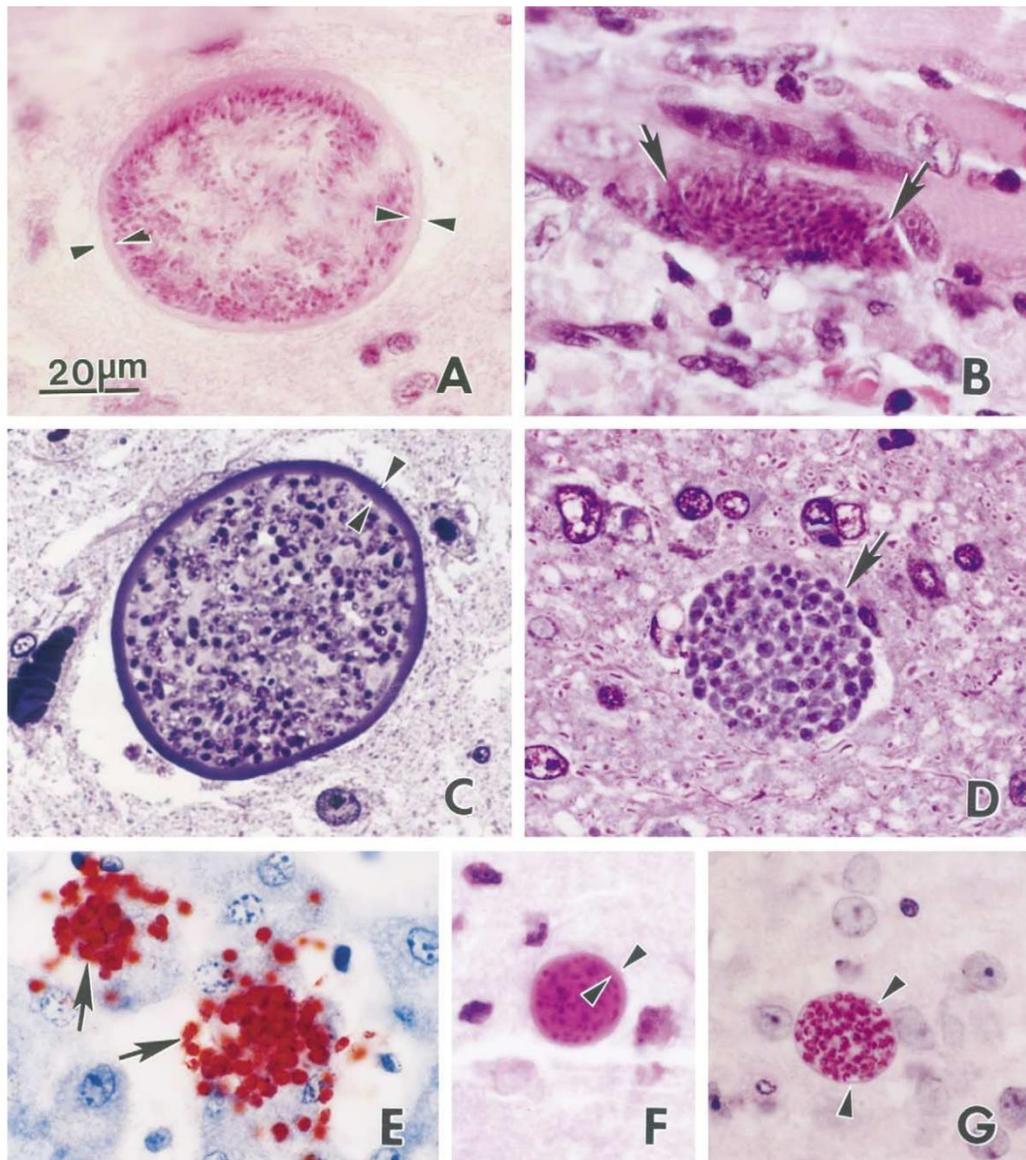


Fig. 3: *N. caninum* (A-F) taquizoítos y quistes de tejido en secciones histológicas de tejidos de perros infectados naturalmente, en comparación con quistes de tejido de *Toxoplasma gondii* (G). El grosor de la pared del quiste de tejido está indicado por las flechas. La barra se aplica a todas las partes. (A) Quiste de tejido del cerebelo de un perro tinción Hematoxilina – Eosina (H&E). (B) Un gran grupo de taquizoítos (flechas) en el músculo esquelético del mismo perro (H&E). (C) Quiste de tejido del cerebro de un perro, Tinción azul de toluidina. (D) Un grupo de taquizoítos (flecha) en

el cerebro de otro perro. Nótese la ausencia de una pared de quiste, Tinción de Giemsa. (E) Taquizoítos (flechas) del hígado del perro teñidos con anticuerpos policlonales contra *N. caninum*. (F) Quiste de tejido en el cerebro de un perro. La cepa NC-1 de *N. caninum* se aisló de este perro. H&E. (G) Quiste de tejido en el cerebro de un ratón infectado experimentalmente, 3 meses postinfección. Reacción de ácido periódico de Schiff (PAS) contratiñida con hematoxilina. Los bradizoítos PAS-positivos están encerrados en una delgada pared de quiste PAS-negativa. Fuente: Dubey, 2002.

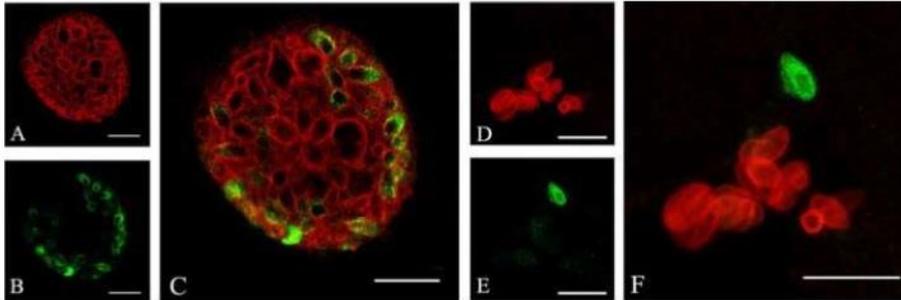


Fig. 4: Doble inmunofluorescencia en células MARC- 145 infectadas con *Nc-Liv*. Parásitos marcados con α SAG1 son rojos (A, D); aquellos marcados con α BAG1 son verdes (B, E). En (C) vacuolas grandes contienen principalmente taquizoítos, con algunos bradizoítos intermedios que reaccionan a ambos anticuerpos. En (F) vacuolas pequeñas que reaccionan solo con α BAG1 comparten célula hospedadora con parásitos SAG1.

Cepas y virulencia

Se pueden detectar infecciones por *N. caninum* en un amplio número de hospedadores. Sin embargo, el desarrollo de la sintomatología clínica se da en un menor número de casos.

La magnitud de la enfermedad podría estar relacionada con la cepa de *N. caninum*. Se conocen distintos aislamientos a partir de varios hospedadores que son genéticamente similares, aunque cada uno posee sus propias características moleculares [6, 7, 35, 308]. Las características moleculares de una cepa pueden ser útiles para realizar estudios epidemiológicos [120].

Es poco lo que se conoce acerca de la variación entre cepas respecto a su virulencia. Algunos estudios demuestran que existen diferencias entre la virulencia de distintas cepas en el modelo murino, y las mismas presentan también diferencias *in vitro* en cultivo celular [144, 306, 307, 321, 322]. No está aún del todo claro cómo pueden verse reflejadas estas variaciones en la virulencia que presentan los ratones en infecciones en otros hospedadores.

Si bien existen distintos aislamientos y cepas caracterizadas de *N. caninum* (**Tabla 2**), llevar a cabo estudios comparativos en hembras preñadas en el modelo bovino estaría limitado debido a su elevado costo y la difícil interpretación [108]. Por otra parte, debido a

que los perros eliminan un número muy bajo de ooquistes, este estadio por lo general no está disponible para llevar a cabo infecciones experimentales. Por este motivo es que suelen emplearse taquizoítos, a pesar de que las características de la enfermedad puedan variar dependiendo del estadio del parásito con el que el animal fue infectado. Además, los estudios comparativos que emplean taquizoítos derivados de células en cultivo suelen ser complicados ya que los aislamientos mantenidos *in vitro* por muchos pasajes pueden ver alterada su virulencia y otras características biológicas [120]. La inducción experimental del aborto puede verse afectada por la cepa, el número de pasaje o la vía de inoculación. En un estudio realizado en 2007 [392] se observó que de las 19 vaquillonas que formaron parte del ensayo y que habían sido desafiadas con 108 taquizoítos de la cepa NC1 por vía subconjuntival, ninguna fue capaz de transmitir la enfermedad a sus crías.

| Denominación | País | Origen de la muestra | Referencia |
|--------------|-------------|----------------------|------------------------------------|
| NC-1 | EE.UU. | Canino Cerebro | (Dubey, Hattel et al. 1988) |
| NC-2 | EE.UU. | Canino Cerebro | (Hay, Shell et al. 1990) |
| NC-3 | EE.UU. | Canino Cerebro | (Cuddon, Lin et al. 1992) |
| BPA-3 | EE.UU. | Ternero Cerebro | (Barr, Anderson et al. 1992) |
| BPA-4 | EE.UU. | Ternero Cerebro | (Barr, Anderson et al. 1992) |
| NC-Liv | Reino Unido | Canino Cerebro | (Barber, Trees et al. 1993) |
| BPA-1 | EE.UU. | Feto Cerebro | (Conrad, Barr et al. 1993) |
| BPA-2 | EE.UU. | Feto Cerebro | (Conrad, Barr et al. 1993) |
| NC-4 | EE.UU. | Canino Cerebro | (Dubey, Dorough et al. 1998) |
| JPA-1 | Japón | Ternero Cerebro | (Yamane, Kokuho et al. 1996) |
| NC-SweB1 | Suecia | Ternero Cerebro | (Stenlund, Björkman et al. 1997) |
| NC-5x | EE.UU. | Canino Cerebro | (Dubey, Dorough et al. 1998) |
| JPA-2 | Japón | Ternero Cerebro | (Yamane, Shibahara et al. 1998) |
| JPA-4 | Japón | Ternero Cerebro | (Yamane, Shibahara et al. 1998) |
| JPA-5 | Japón | Ternero Cerebro | (Yamane, Shibahara et al. 1998) |
| BT2 | Japón | Ternero Cerebro | (Yamane, Shibahara et al. 1998) |
| CN-1 | EE.UU. | Canino Cerebro | (Marsh, Barr et al. 1998) |
| NC-LivB1 | Reino Unido | Ternero Cerebro | (Davison, Otter et al. 1999) |
| NC-PV1 | Italia | Ternero Cerebro | (Magnino, Vigo et al. 1999) |
| NC-LivB2 | Reino Unido | Feto Cerebro | (Hemphill and Gottstein 2000) |
| NC-Beef | EE.UU. | Ternero Cerebro | (McAllister, Björkman et al. 2000) |
| KBA-1 | Corea | Ternero Cerebro | (Kim, Sohn et al. 2000) |
| KBA-2 | Corea | Feto Cerebro | (Kim, Sohn et al. 2000) |
| NC-GER1 | Alemania | Canino Cerebro | (Peters, Wagner et al. 2000) |
| BT-3 | Japón | Vaca Cerebro | (Sawada, Kondo et al. 2000) |
| NC-Bahia | Brasil | Canino Cerebro | (Gondim, Pinheiro et al. 2001) |

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------------|--|
| NC-Porto1 | Portugal | Feto Cerebro | (Canada, Meireles et al. 2002) |
| NC6-Argentina | Argentina | Canino Heces | (Basso, Venturini et al. 2001) |
| NC7-Japón | Japón | Oveja Cerebro | (Koyama, Kobayashi et al. 2001) |
| NC-Nowra | Australia | Ternero Cerebro | (Miller, Quinn et al. 2002) |
| Nc-Illinois | EE.UU. | Ternero Cerebro | (Gondim, Gao et al. 2002) |
| BNC-PR1 | Brasil | Ternero Cerebro | (Locatelli-Dittrich, Richartz et al. 2003) |
| NC-axis | Argentina | Ciervo Cerebro | (Basso et al. 2014) |
| NC-Argentina LP1 | Argentina | Ternero Cerebro | (Campero et al. 2015b) |
| NC-Argentina LP2 | Argentina | Ternero Cerebro | (Campero et al. 2020) |

Tabla 2: Aislamientos de *N. caninum*. Collantes-Fernández, 2009, Campero et al. 2020.

Neosporosis Bovina

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria que afecta a los bovinos, causada por *N. caninum*. La misma puede provocar abortos por lesiones fetales inflamatorias o degenerativas, principalmente a nivel del sistema nervioso central, corazón, músculo e hígado; fetos autolíticos o momificados y acumulación de líquido en la cavidad corporal; nacimiento de terneros débiles con escasa sobrevivencia y/o con sintomatología nerviosa o bien el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero crónicamente infectados [190].

Esta enfermedad, es considerada una de las principales causas de aborto a nivel mundial y genera importantes pérdidas económicas. Al aborto, se añaden bajas en la producción (de carne y leche), el aumento en la tasa de reposición, la reducción de la tasa de crecimiento y el incremento del intervalo parto-concepción [190].

Los bovinos pueden infectarse a través de la ingesta de alimento contaminado con ooquistes presentes en las heces de perros u hospedadores definitivos en general [239, 248] o por infección congénita a través de la madre al feto por vía transplacentaria [100, 287]. Sin embargo, la transmisión postnatal es responsable de menos del 15% de los casos de neosporosis en el campo [163].

Los ooquistes cumplen un rol importante en la epidemiología de la neosporosis. Al igual que los ooquistes otros coccidios, éstos presentan resistencia una vez que se liberan al medio ambiente [12, 368]. Además, los ooquistes de *N. caninum* son estructuralmente similares a los de *Hammondia heydorni*, otro coccidio cuyos ooquistes también se encuentran en las heces de los perros [110]. Por esta razón es que, para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad, sería importante establecer técnicas diagnósticas que permitan identificar correctamente los ooquistes de *N. caninum* [110, 346].

En los últimos años se han reportado algunos estudios en el desarrollo de herramientas moleculares para diferenciar a *N. caninum* de *H. heydorni* que han sido evaluadas en tejidos de ratones [26]. Inicialmente, la transmisión vertical de la neosporosis fue descrita en perros. Se cree que la madre puede transmitir el parásito a sus crías durante los últimos estadios de la preñez o bien post parto a través de la lactancia. A diferencia de lo que ocurre en el bovino, la transmisión vertical de *N. caninum* en caninos parece ser altamente variable e incapaz de persistir en ausencia de la infección horizontal [120].

La transmisión congénita en bovinos puede ocurrir en sucesivos ciclos reproductivos y los animales crónicamente infectados pueden sufrir una reactivación del parásito durante la preñez, transmitiendo así la enfermedad a sus crías [53]. De esta manera, el parásito puede instalarse y persistir en el campo por muchos años, volviendo poco efectivas a las medidas de control y saneamiento recomendadas (restringir el empleo de perros manteniéndolos alojados en forma aislada en lugares con cerco para impedir la difusión de sus heces, impedir el acceso de perros a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado y pasturas, evitar el contacto de perros con productos de abortos bovinos y alimentarlos con carne vacuna previamente cocida; entre otras [108]. Esto hace necesario y urgente el desarrollo de nuevas vacunas o estrategias de inmuno intervención, que sean capaces de controlar la neosporosis de manera segura y efectiva. La vía venérea y lactogénica fueron propuestas como posibles medios de transmisión de la neosporosis. Se ha detectado ADN de *N. caninum* en leche y calostro [264], y se comprobó que terneros recién nacidos pueden resultar infectados luego de ingerir leche suplementada con taquizoítos [100], pero la transmisión lactogénica de *N. caninum* no se ha demostrado en condiciones naturales [101, 102]. A pesar de haberse detectado la presencia de taquizoítos en semen [282], las vaquillonas cruzadas con toros infectados no seroconvirtieron [285].

El ganado bovino de leche se considera el más susceptible a neosporosis comparado con el ganado vacuno de carne [311]. Los bovinos pueden infectarse a través de la ingesta de alimento contaminado con ooquistes presentes en las heces de perros que son en general, los hospedadores definitivos del parásito [239, 248] o por infección congénita a través de la madre al feto por vía transplacentaria [100, 287]. Sin embargo, en condiciones a campo, la transmisión postnatal es responsable de menos del 15% de los casos de neosporosis [163].

La transmisión vertical en bovinos es la vía principal de contagio, con una frecuencia de hasta el 93,7% [269]. A su vez, la vía congénita puede ocurrir en sucesivos ciclos reproductivos y los animales crónicamente infectados pueden sufrir una reactivación del parásito durante la preñez, con la posterior transmisión de la enfermedad a sus crías. De esta manera, el parásito puede instalarse y persistir en el campo por muchos años,

volviendo poco efectivas a las medidas de control y saneamiento recomendadas, que son: (i) restringir el ingreso de perros manteniéndolos alojados en forma aislada en lugares con cerco para impedir la difusión de sus heces; (ii) impedir el acceso de los cánidos domésticos a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado y pasturas; y (iii) restringirles a los cánidos el contacto con productos de abortos bovinos que comúnmente suelen consumir [108]. La dificultad asociada al manejo de esta enfermedad evidencia la necesidad del desarrollo de nuevas vacunas o estrategias de inmuno intervención, que sean capaces de controlar la neosporosis de manera efectiva y segura.

Sintomatología clínica

La infección por *N. caninum* es la principal causa de aborto en el ganado bovino, tanto lechero y de cría [120]. Los abortos por neosporosis pueden producirse en cualquier momento del año y en hembras de cualquier categoría a partir del primer tercio de la preñez y hasta el final de la misma. La mayoría, sin embargo, ocurre entre el quinto y el séptimo mes [11]. En algunos campos considerados epidémicos para neosporosis se ha reportado que hasta el 57% de los animales han abortado. Estas tormentas de abortos se consideran epidémicas si más del 10-12,5% de los animales en riesgo abortan dentro de un plazo de 6 a 8 semanas. El riesgo que el ganado bovino presente abortos de manera repetida debido a neosporosis es menor (5%) [108, 286].

Los signos clínicos, además del aborto incluyen, signos neurológicos, disminución en la ganancia de peso y una menor relación edad-peso. Las articulaciones del tren posterior y/o anterior pueden estar en flexión o hiperextensión y, mediante un examen neurológico, se puede detectar ataxia, disminución de reflejo patelar y pérdida de la propiocepción. También se ha reportado, de manera aislada, la presencia de exoftalmia, asimetría en los ojos e incluso alteraciones al nacimiento, como ser, hidrocefalia o estenosis espinal [120].

Patogenia del aborto

La neosporosis bovina es una enfermedad que afecta principalmente la placenta, en respuesta a una parasitemia de la madre que puede ser producto de una infección primaria (exógena) o del recrudecimiento de una infección persistente (endógena) durante la preñez [108].

El daño en la placenta a causa del parásito puede poner en riesgo la vida del feto de manera directa, o estimular la producción de prostaglandinas maternas que pueden causar luteólisis dando como resultado el aborto. El daño fetal, puede deberse por lesiones tisulares causadas por la multiplicación del parásito en el feto o por hipoxia y bajo aporte de nutrientes, resultado del daño en la placenta. El daño en órganos vitales a veces es tan extenso que puede causar muerte fetal. Se ha sugerido que el aborto también podría estar

asociado a la producción de citoquinas pro-inflamatorias en la placenta o a una desregulación hormonal [192, 226]. La producción de citoquinas reguladoras (como IL-10) o pro-inflamatorias (como IFN- γ) y el daño directo sobre el feto debido a la multiplicación del parásito puede determinar si un feto sobrevive o no [8, 192]. Si bien todos estos factores están relacionados, pueden adquirir más o menos relevancia de acuerdo con el estadio de la preñez.

El riesgo de transmisión vertical y la enfermedad en el feto, está relacionado en parte al estadio de la preñez en el momento de la infección. La tasa de transmisión vertical se incrementa con la edad gestacional quizás debido a la mayor vascularización de la placenta, que parece ser más permeable en el último trimestre [108, 113].

Interacción parásito y hospedador

Regulación del sistema inmune durante la preñez

Durante la preñez el sistema inmunitario materno tiene que ser capaz de tolerar un feto semi-alogénico, producto de dos individuos histo-incompatibles. Tradicionalmente se postuló que la madre debería generar cierto grado de inmunosupresión, para no rechazarlo [250].

Actualmente, nuevos avances en la inmunología permiten comprender que el sistema inmune de la madre debe tolerar al feto y proteger a la madre y al feto en desarrollo de infecciones durante la preñez. Esto indica que una preñez exitosa depende de la capacidad del sistema inmune materno de generar una respuesta tolerogénica frente a los antígenos paternos, pero manteniendo la capacidad de rechazar al feto en caso de una posible infección [88].

La respuesta inmune de la hembra preñada es regulada por un conjunto complejo de citoquinas. Se propuso que durante la preñez se genera una respuesta T-colaboradora tipo 2 para promover la tolerancia al feto, de manera similar a lo que ocurre en tejidos trasplantados [71, 128, 360, 380]. Sin embargo, actualmente se sabe que existe una modulación dinámica del entorno de citoquinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias. La primera fase de la preñez es predominantemente pro-inflamatoria. Se genera una activación local de la respuesta inflamatoria que le permite a la madre reparar el daño tisular ocasionado por la invasión del blastocisto. La segunda fase es predominantemente antiinflamatoria, y la respuesta tipo Th2 puede ser sistémica o local a nivel de la interfase materno-fetal. Por último, durante el parto se vuelve a establecer una respuesta inflamatoria. La inflamación se controla estrictamente durante la preñez, ya que la respuesta inflamatoria excesiva o persistente se asocia a distintos resultados adversos [88].

Mientras el entorno de citoquinas favorece la respuesta antiinflamatoria, con elevados niveles de IL-10 sintetizada principalmente por las células del trofoblasto, las citoquinas pro-inflamatorias capaces de limitar la multiplicación de *N. caninum* (IL-2, IL-12 e IFN- γ) son reguladas negativamente, lo que podría explicar la transmisión congénita de la enfermedad en el bovino, ya sea por recrudescencia de infecciones latentes o por infecciones de novo [88].

Las hembras no preñadas, pero experimentalmente infectadas con *N. caninum* no presentan signos clínicos de la enfermedad. El IFN- γ producido principalmente por células CD4+ es capaz de limitar la multiplicación intracelular del parásito, que persiste como bradizoíto en quistes tisulares principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Por el contrario, la infección experimental durante los primeros estadios de la preñez puede tener consecuencias severas para el feto. Si este se infecta, es probable que pueda montar una respuesta efectiva por la inmadurez de su sistema inmune. Por otro lado, aún puede inducirse la síntesis de IFN- γ en la madre, en respuesta al parásito, lo que también podría explicar los abortos en esta fase de la preñez. Hacia la mitad de la preñez, se observa una importante inmunomodulación de la respuesta de IFN- γ y la linfoproliferación, lo que podría favorecer la reactivación de infecciones latentes y la transmisión transplacentaria del parásito. En este estadio de la gestación, un feto podría sufrir consecuencias severas o bien podría nacer persistentemente infectado, con o sin sintomatología clínica. Por último, en estadios tardíos de la preñez es menos probable que la transmisión vertical del parásito cause aborto o daño severo en el feto, **(Fig. 5)** probablemente debido a que su sistema inmune se encuentra más maduro y desarrollado [190].

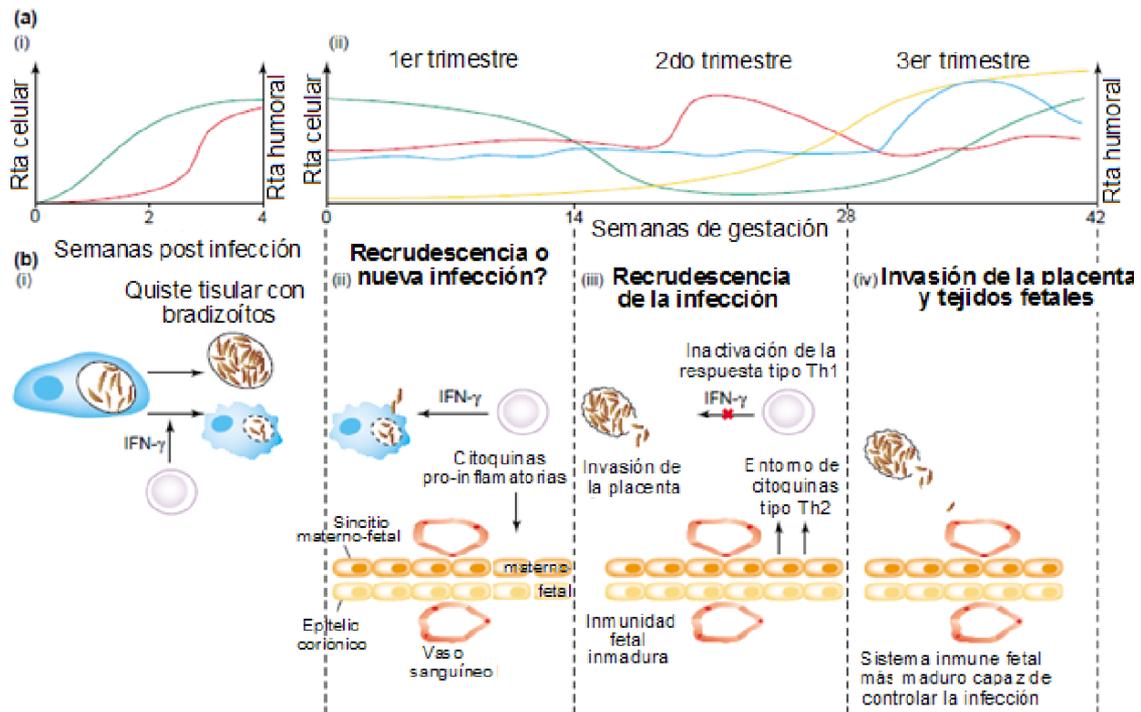


Fig. 5: Diferentes aspectos de la relación huésped-parásito en hembras bovinas preñadas y no preñadas, fuente: Innes, et. al., 2002. **ai)** Desarrollo de la inmunidad mediada por células (IMC, verde), involucrando la proliferación celular y producción de IFN- γ y respuestas de anticuerpos (rojo) siguiendo la infección experimental de animales no preñados con *N. caninum*. En animales no preñados, la infección con *N. caninum* usualmente no causa enfermedad clínica. El IFN- γ producido por células T CD4+ (violeta) es capaz de limitar la multiplicación de parásitos intracelulares y es un importante componente de la inmunidad protectora (**Fig. bi**). La figura **aii** muestra la magnitud relativa de las respuestas IMC específicas (verde) a *N. caninum* y diferentes ejemplos de respuestas de anticuerpos a través de toda la gestación en ganado, donde la parasitemia ocurre a la mitad de la gestación (rojo) o en la gestación tardía (azul). La madurez relativa de la respuesta inmune fetal está indicada en amarillo. La causa de aborto en la preñez temprana es causada por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias de células T colaboradoras tipo 1 en la interfase materno-fetal (**Fig bii**). Una significativa inmunomodulación de la proliferación celular y respuesta de IFN- γ ocurre a la mitad de la preñez lo cual puede ser un desencadenante para la recrudescencia de la infección debido a la exquistación de los parásitos contenidos dentro de los quistes tisulares (**Fig. biii**). El ambiente de citoquinas tipo 2 en la interfase materno-fetal favorece la invasión del parásito de la placenta y la infección del feto. En este momento de la gestación, las consecuencias de la infección pueden ser la muerte fetal o el nacimiento de animales congénitamente infectados y presencia de signos principalmente neurológicos (al nacimiento). Es menos probable que la transmisión vertical del parásito al feto en la gestación tardía resulte en aborto, presumiblemente debido a la madurez relativa del sistema inmune fetal (**Fig. biv**). (Modificado de Innes y col, 2002).

La infección por ambas vías, endógena o exógena puede ser causa de aborto. Dependiendo del estadio de gestación en la cual se produce la infección intrauterina, la neosporosis puede estar asociada a abortos, nacimiento de terneros débiles, con sintomatología nerviosa o terneros sin síntomas y aparentemente sanos pero infectados de manera crónica [192]. Por lo tanto, enfocarse en medidas de control para reducir los niveles de transmisión vertical de la enfermedad en el ganado bovino sería lo deseado.

La respuesta inmune de Tipo th1 es conocida por jugar un importante rol en la protección frente a patógenos intracelulares. Este tipo de respuesta por lo general esta disminuida en algunos estadios durante de la preñez, y esta situación se ha relacionado con el aumento de la frecuencia de transmisión vertical [386]. La neosporosis en el modelo murino [225] describen que la inducción de la respuesta tipo th1 de la madre contra *N. caninum*, podría prevenir la transmisión vertical y demostraron que la modulación de las citocinas tipo 2 que dan anticuerpos monoclonales anti-IL-4 antes del embarazo puede reducir la frecuencia de transmisión vertical de *N. caninum*. Los estudios sobre la transmisión vertical se basan en modelos experimentales, por lo que la mayoría de la información disponible sobre la respuesta inmunitaria y la prevención de infecciones congénitas se relacionan con la infección aguda. En condiciones naturales, las vacas con infección crónica juegan un rol importante en la persistencia del parásito en el ganado.

Los estudios serológicos son empleados con frecuencia a través de métodos de ELISA. Los ELISA se pueden aplicar para valorar una subclase específica de anticuerpos, por ejemplo, la relación IgG1 / IgG2 estimada por la titulación de anticuerpos. En este caso, las pruebas de ELISA se utilizan como un marcador para conocer ya sea el predominio de la respuesta de tipo 1 o tipo 2, después de la inmunización o infección [211, 349].

Se estudiaron a campo las respuestas isotípicas en vacas preñadas que estaban infectadas de manera crónica y que abortaron. Hallaron que, la presencia de IFN- γ y valores elevados de anticuerpos IgG2 podrían proteger al ganado vacuno infectado de manera crónica contra el aborto por *N. caninum*, mientras que en ausencia de IFN- γ , con predominio de anticuerpos IgG2, no aumentaría su protección [10].

En estudios previos, se describió que la infección transplacentaria estaba asociada a un aumento de títulos de anticuerpos IgG2 anti *N. caninum* [161].

Factores de riesgo

Es importante establecer cuáles son los factores de riesgo asociados a la neosporosis bovina para mejorar las medidas de control y saneamiento. La presencia de cánidos domésticos en los rodeos puede aumentar el riesgo de infección, ya que, como hospedadores definitivos, pueden contaminar a través de las heces (con ooquistes) la comida y el agua de las que se alimenta el ganado. Por otra parte, puede aumentar la probabilidad de seropositividad en los bovinos a través hábitos frecuentes de los perros, como ser ingestión de productos de abortos [120]. También es importante controlar el acceso al rodeo de otros cánidos salvajes como coyotes o zorros [108].

En un estudio realizado en Argentina, se reportó que la tecnología de transferencia de embriones podría minimizar la transmisión vertical de la neosporosis. Se comparan 16 vaquillonas nacidas por servicio natural con 15 nacidas por transferencia de embriones, todas provenientes de animales infectados. En el primer grupo todas las vaquillonas resultaron seropositivas para *Neospora*, y 6 de estas vacas preñadas, terminaron en aborto. En el segundo grupo, todos los animales resultaron seronegativos y sólo se registraron dos abortos [78]. Otro factor que parece estar relacionado con la probabilidad de infección es la edad del ganado. Un animal tiene más riesgo de ser seropositivo cuánto mayor es su edad o el número de preñeces llevadas a cabo [330]. Asimismo, parecen existir diferencias entre los rodeos de carne y lechero. Los abortos en el ganado lechero parecen darse en estadíos más tempranos de la preñez [260].

Se ha descrito que otras infecciones pueden agravar la neosporosis. En un rodeo de Italia, el 27% de un total de 948 animales infectados con *N. caninum* presentó una co-infección con Herpesvirus bovino-1 y fue propuesto como un potencial factor de riesgo para la neosporosis bovina [320]. En otro ensayo en Vietnam, se vio una fuerte asociación entre el virus de Diarrea Viral Bovina y *N. caninum* [123]. Estas asociaciones no se observaron para *Mycobacterium avium* paratuberculosis y el virus de leucosis bovina [370]. Tampoco se encontró asociaciones con efectos relacionados al clima (aridez) o el pH del suelo [338, 339].

Estudios basados en el uso de biología molecular demostraron que *N. caninum* tiene una amplia gama de huéspedes intermediarios, un hallazgo que ha ayudado a dilucidar la epidemiología de la enfermedad. Las aves pueden contribuir a la diseminación del parásito, principalmente por su comportamiento como alimentarse en el suelo, consumen el grano de los silos o lugares donde se almacena el alimento destinado al ganado, están expuestas a patógenos y son presas de los cánidos, contribuyendo al ciclo de vida del parásito [29].

Estudios a través de métodos meta analíticos utilizados para asociar la neosporosis bovina con diferentes factores de riesgo, encontraron una correlación significativa entre el aborto e infección. Además, por la presencia de perros en el lugar donde se encuentran los bovinos, y por otro lado, el tipo de producción, siendo el ganado lechero el más susceptible si se lo compara con el de cría [311].

Vacunas en el mercado

Durante algunos años existió en el mercado una vacuna anti *N. caninum* (Bovilis® Neoguard, Intervet) basada en una preparación de taquizoítos muertos. El esquema de vacunación recomendado eran dos dosis vía subcutánea separadas por un intervalo de 3-4 semanas durante el primer trimestre de la preñez. En un ensayo llevado a cabo en Costa

Rica, en 25 tambos, se reportó 11,2% de abortos en animales vacunados y 20,8% de abortos en el grupo control, con una eficacia moderada [323]. Sin embargo, en un ensayo en Nueva Zelanda, de un total de 2246 animales distribuidos en 5 campos, 10,7% de las vacas y 12,6% de las vaquillonas eran seropositivas para *N. caninum*. Luego de 6 semanas post segunda dosis, en uno de los campos estudiados se registró que 188/232 (81.0%) de los animales vacunados seroconvirtieron, mientras que en el grupo control seroconvirtieron 11/130 (8.5%) de las vacas y 10/36 (27.8%) de las vaquillonas. Se registraron 48 y 63 abortos en los animales vacunados y controles, respectivamente [384]. En otro campo que presentaba un elevado porcentaje de abortos, se registró un porcentaje de abortos del 8,4% en animales vacunados y 8,7% en controles. En los 3 campos restantes se observaron menos abortos que los esperados. A los 6-9 meses de edad se midieron anticuerpos totales anti *N. caninum* en los terneros. Entre los terneros nacidos de animales vacunados, 14/17 resultaron seropositivos; mientras que en el grupo control esta proporción fue de 13/23. Según este estudio, la vacunación con Bovilis® Neoguard incrementaría el riesgo de transmisión vertical del parásito, y sólo se previnieron abortos en uno de los 5 campos estudiados [384]. Finalmente, y a la luz de estos resultados, esta vacuna fue retirada del mercado.

Actualmente no existe ninguna vacuna comercial disponible. Se comercializa una vacuna contra la toxoplasmosis (Toxovax™), con licencia para ser utilizada en ovejas en Europa y Nueva Zelanda, que no induce una respuesta protectora contra la infección por *N. caninum* [189, 191]. Ésta contiene taquizoítos atenuados de una cepa que solamente produce un ciclo replicativo (S48). Sin embargo, existen algunos problemas relacionados a la seguridad de esta formulación, al igual que con cualquier vacuna que contenga patógenos vivos atenuados [74]. No hay en el mercado ninguna vacuna contra parásitos apicomplejos basada en antígenos recombinantes. No obstante, algunas vacunas basadas en antígenos nativos han resultado efectivas. CoxAbic™ está compuesta por antígenos purificados de gametocitos de *Eimeria máxima* y confiere protección a gallinas y sus crías contra la coccidiosis mediante anticuerpos específicos a través de la yema de huevo [343]. NobivacPiro™, compuesta por antígenos solubles de dos especies de *Babesia*, confiere protección contra la babesiosis en perros [335]. El éxito de estas vacunas en prevenir enfermedades parasitarias es una prueba sólida de que las vacunas a subunidades pueden resultar efectivas, estimulando el desarrollo de formulaciones con antígenos recombinantes [256].

Respuesta inmune protectora

N. caninum es un parásito intracelular obligado. Es decir, que la respuesta inmune mediada por células (IMC) tiene un rol muy importante en el mecanismo de protección. Se describió que el tratamiento de fibroblastos de ovejas *in vitro* con IFN- γ resulta en una inhibición significativa de la multiplicación del parásito respecto a células que no recibieron tratamiento [192]. En el caso de ratones deficientes para IFN- γ (IFN- γ -/- no muestran un incremento del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHCII) en la superficie de macrófagos peritoneales ni proliferación de células T frente a una infección experimental. Sin embargo, esto se revierte con un tratamiento *in vivo* de IFN- γ exógeno. En animales resistentes a la infección se detectan elevados niveles séricos de IFN- γ e IL-4, mientras que en animales IFN- γ -/- se detecta IL-10 [270].

En estudios *in vitro* de fibroblastos en modelo murino y células de riñón canino se observa que la presencia de IFN- γ causa una disminución en la viabilidad de las células infectadas y un aumento de la apoptosis [271]. También se demostró *in vitro* que, el IFN- γ junto a TNF- α inhiben la multiplicación de taquizoítos en cultivos primarios de células cerebrales de bovinos [391].

Trabajos experimentales en ratones tratados con anticuerpos anti- IFN- γ mostraron un incremento en la mortalidad y focos de necrosis hepática, pérdida de peso y mayor carga parasitaria en pulmones 7 días post infección en comparación con ratones controles [37]. Por el contrario, en los animales tratados con IL-12 recombinante se observó una disminución de la encefalitis y de la carga parasitaria en el cerebro 3 semanas post-infección, asociado a una producción de anticuerpos predominantemente del isotipo IgG2a y un aumento significativo de la relación IFN- γ / IL-4. La inducción de la respuesta tipo Th-1 mediada por la IL-12 es dependiente de la producción de INF- γ , tal como se demuestra con ensayos de neutralización. Es además un fenómeno transitorio y relacionado con el control de la infección, ya que no se observan diferencias entre los animales tratados y los controles a las 6 semanas post infección [37]. En conjunto, todos estos ensayos muestran que la producción temprana de IFN- γ tiene un rol importante en la inducción de la respuesta inmune protectora contra la infección aguda a *N. caninum*.

Estudios de inmunidad contra *N. caninum* en bovinos demostraron que son las células T CD4+ productoras de IFN- γ y son las que controlan la infección [353, 354]. En *T. gondii* por el contrario, son los linfocitos T CD8+ los componentes principales de la respuesta inmune frente a una primoinfección [162, 359], También se demostró que los taquizoítos vivos o atenuados de *N. caninum* y *T. gondii* inducen la producción de IFN- γ por parte de células natural killer (NKs) bovinas activadas por IL-12. Esta respuesta es independiente de IL-12, pero se incrementa de manera significativa cuando se le adiciona esta citoquina. Existe una respuesta similar cuando se incuban NKs bovinas con fibroblastos autólogos

infectados con taquizoítos. Además, estos fibroblastos infectados son más susceptibles a la citotoxicidad por parte de las NKs [57]. En un modelo de infección experimental en bovinos se demostró que a pesar de que las células T CD4+ son la principal fuente de IFN- γ , las células NK y T CD8+ contribuyen en la producción de dicha citoquina en estadios tempranos de la infección [200].

Se ha determinado que bovinos infectados en forma natural o experimental desarrollan anticuerpos específicos, presentan proliferación de células T-CD4+ y producción de IFN- γ en respuesta a taquizoítos y ooquistes [15, 161, 228, 239, 386]. No se ha podido determinar con exactitud el rol de los anticuerpos en la respuesta de protección, pero se propone su participación en el control de la dispersión de *N. caninum* neutralizando a los taquizoítos en estadio extracelular [190].

Los mecanismos a través de los cuales *N. caninum* logra una diseminación sistémica eludiendo las barreras biológicas no están del todo claros. Se ha identificado a las células dendríticas como transportadoras sistémicas de taquizoítos que logran inducir la migración de estas células [98, 206, 207]. *N. caninum* puede infectar distintas células del sistema inmune como células dendríticas, macrófagos y linfocitos, células de manera similar a *T. gondii* [57, 103, 355], que contribuye a su propagación parasitaria.

Diagnóstico

En el diagnóstico del aborto bovino por *N. caninum*, la historia clínica del animal y los datos epidemiológicos del rodeo son orientativos. Sin embargo, para el diagnóstico definitivo es necesario tomar muestras del feto y la madre para su análisis correspondiente. Para definir un aborto causado por *N. caninum*, se debe demostrar la presencia del protozoo y a su vez, descartar otras posibles causas de aborto [256]. Aunque lo ideal es enviar el feto completo al laboratorio, las muestras de elección son: el cerebro, el corazón, el hígado y la placenta, las localizaciones más frecuentes de lesiones y del protozoo [115].

Por otro lado, uno de los métodos directos más utilizado para la detección de *N. caninum* en tejidos como ser el SNC es la IHQ [298]. En la práctica habitual bajo esta metodología se analizan los tejidos fetales que presentan lesiones compatibles observadas a la histopatología, con el fin de confirmar la presencia de antígenos, taquizoítos enteros o quistes con bradizoitos. Es una técnica poco sensible para detectar protozoos en el feto debido a que existen en escaso número en los tejidos infectados y porque la demostración de los antígenos de *N. caninum* mediante IHQ depende del número de cortes histológicos realizados y del tiempo invertido en examinarlos. Además,

el estado frecuentemente autolítico de los fetos disminuye la precisión diagnóstica [54, 390].

Por las desventajas mencionadas para la IHQ, en los últimos años se han desarrollado varios protocolos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su impacto ha sido notable por tratarse de una técnica sensible y específica, de rápida ejecución, con tolerancia a la calidad de la muestra original, gastos relativamente bajos y facilidad de ejecución en un laboratorio de diagnóstico que posea el equipamiento requerido [327]. Así, la PCR permite confirmar infecciones mediante la identificación del ADN del parásito, permite en tejidos fijados en formol, en fresco y hasta autolíticos. La rapidez, la elevada sensibilidad y especificidad, permiten calificarla como una técnica de elección [108].

Sin embargo, establecer el diagnóstico de aborto por *N. caninum* es complejo debido a que las infecciones congénitas asintomáticas son habituales y determinar la presencia del parásito o su ADN no implica que el aborto haya sido ocasionado por el protozoo. Por lo tanto, es necesario el criterio de un patólogo para arribar a un diagnóstico final [283].

Se han desarrollado otras técnicas moleculares en estudios de patogenia, epidemiológicos y filogenéticos. Para evaluar la transmisión congénita en tejidos recolectados de fetos bovinos abortados, se ha descrito una PCR anidada [167]. También se han desarrollado PCR cuantitativas con mayor sensibilidad de su aplicación fundamentalmente para investigación [132]. El diagnóstico mediante el aislamiento es poco frecuente y no suele ser exitoso, por ello son escasos los aislamientos reportados a nivel mundial. El aislamiento se puede realizar a partir de material infectado, sobre cultivos celulares y/o animales de laboratorio [80, 113].

Para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* se han desarrollado diferentes pruebas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), enzimoimmunoensayo (ELISA), Western Blot (WB) y prueba de aglutinación, aunque las más utilizadas han sido IFAT y ELISA.

Serología e histopatología: Técnicas y alcances

En cuanto a los fluidos fetales, el más útil para el diagnóstico serológico es el líquido peritoneal. En fetos abortados, el principal método de diagnóstico se ha basado en el examen histopatológico mediante la tinción con Hematoxilina – Eosina y la observación de lesiones de los tejidos fetales formolados, que permiten emitir un diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* [14].

Las técnicas serológicas son útiles para demostrar el contacto del hospedador con el parásito, pero poseen un valor limitado a la hora de establecer de manera individual, si la causa del aborto fue realmente la infección por *N. caninum* [111, 246, 287, 288].

- Inmunofluorescencia indirecta (IFAT): Fue la primera prueba utilizada para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*, ha sido y continúa siendo ampliamente aplicada al diagnóstico de la enfermedad. Es considerada la técnica estándar para comparación con otras. Detecta anticuerpos específicos y no presenta reacciones cruzadas con otros protozoarios relacionados [116]. Un suero bovino positivo a IFAT en una dilución 1:200 puede ser considerado como indicativo de infección. Este título de corte se estima que tiene una sensibilidad de 85,7- 90 % y una especificidad de 82,4 y 97 % [17]. Sin embargo, en el ganado bovino adulto se han empleado puntos de corte a partir de diluciones de 1:25 [371]. Cuando se utilizan fluidos de cavidades fetales, se ha recomendado hacer las lecturas a diluciones de 1:10 hasta título final [84]. ELISA: de sensibilidad y especificidad elevadas, esta prueba tomó relevancia debido a la sencillez y la rapidez de ejecución y fácil interpretación de los resultados, evitando la subjetividad de la IFAT [79, 283]. Se realizaron trabajos donde se compararon los resultados del ELISA indirecto con la IFAT, obteniéndose una buena concordancia entre ambas técnicas [124, 378]. Una variante de esta técnica es la prueba de ELISA de avidéz que tiene la capacidad de diferenciar entre una infección aguda y crónica, basándose en un incremento del reconocimiento y la unión a determinados epítopes por parte del sistema inmune tras la exposición previa al parásito [51]. Además, puede diferenciar brotes de abortos epidémicos de endémicos [332]. En forma similar, se ha desarrollado un ELISA que utiliza proteínas recombinantes rNcGRA7 y rNcSAG4 que, usadas en paralelo, pueden ayudar a discriminar entre primo infecciones, infecciones, reagudización e infecciones crónicas [4].
- Western Blot (WB): Permite identificar reacciones entre anticuerpos presentes en el suero con distintos antígenos parasitarios inmunodominantes según su peso molecular. Es considerada una prueba confirmatoria frente a resultados dudosos por otras técnicas serológicas debido a su elevada sensibilidad y especificidad [79]. Otras técnicas de diagnóstico serológico que se han desarrollado, aunque no son usadas con frecuencia son, la micro aglutinación o la prueba directa en membrana [79].

En los establecimientos bovinos (cría y lechería) donde el estatus sanitario de la enfermedad es desconocido, se recomienda realizar un muestreo serológico para estimar la prevalencia. Ante una nueva exposición al agente del medio ambiente o introduciendo

individuos, los animales podrían infectarse, por lo que se deberá hacer un seguimiento serológico al menos una vez por año, además de realizar diagnóstico serológico a todo bovino que ingrese al establecimiento. A pesar de esto, se ha demostrado que la eliminación de los vientres positivos no logra bajar la tasa de reinfección, esto indica que como única medida de control no es suficiente y además en muchos casos no es viable económicamente [79]. Si la prevalencia es mayor al 20% se sugiere un saneamiento a largo plazo por más de 5 años, reponiendo los animales seropositivos con vaquillonas seronegativas. Lo ideal es realizar el sangrado de las terneras previa ingesta de calostro para no retener y criar una ternera potencialmente positiva.

Debido a que es probable que la mayoría de los fetos abortados se autolizcen, incluso el tejido cerebral semilíquido debe fijarse en formalina neutra tamponada al 10% para el examen histológico de las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (HE). La inmunohistoquímica es necesaria porque generalmente existe baja carga de *N. caninum* presentes en los tejidos autolizados y estos a menudo, no son visibles en las secciones teñidas con HE. La lesión más característica de la neosporosis es la encefalitis focal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa [25]. La hepatitis es más común en los abortos epizooticos que en los esporádicos. Las lesiones también están en la placenta, pero los protozoos a menudo son difíciles de encontrar.

La inmunotransferencia con antígeno específico de *N. caninum* mejora el diagnóstico. Aunque se puede utilizar suero sanguíneo o líquidos fetales para el diagnóstico serológico, el líquido peritoneal es mejor que otros líquidos corporales. En los terneros recién nacidos, se puede enviar suero, que haya sido privado de calostro, es decir, el proceso donde la toma de muestra del ternero es previa, a la ingesta del calostro, útil para el diagnóstico de infección congénita.

El título de anticuerpos que debe considerarse como valor de corte para el diagnóstico de neosporosis no se ha establecido para los bovinos debido a la incertidumbre del diagnóstico serológico en animales con infección crónica y la disponibilidad de sueros de ganado no infectado. En los ensayos serológicos, los valores de títulos y absorbancia dependen de la composición del antígeno, los anticuerpos secundarios y otros reactivos. Además, los niveles de corte se pueden seleccionar arbitrariamente para proporcionar la sensibilidad y la especificidad requeridas para una aplicación particular. Los títulos de anticuerpos en general son más altos en el ganado que ha abortado debido a la neosporosis que en el ganado con preñeces normales; sin embargo, los títulos en vacas individuales no pueden determinar la etiología de los abortos.

Hallazgos de *N. caninum* por medio de estudios histopatológicos, a través de lesiones microscópicas, pueden ser hallados en una variedad de tejidos fetales, pero la observación más común es una encefalitis multifocal no supurativa y una miocarditis [25]. En los fetos

bovinos y neonatos, las áreas multifocales de necrosis rodeadas de células inflamatorias son comúnmente observadas en cerebro, médula espinal, corazón, pulmón, y placenta [25]. Es necesaria la evidencia que corrobore la infección por *N. caninum* porque otros protozoarios como el *Sarcocystis* spp, podrían causar lesiones similares en fetos abortados. El diagnóstico confirmatorio de *N. caninum* se basa en la prueba de tinción para inmunohistoquímica de sección de tejidos utilizando anticuerpos específicos para el parásito [222], o a través de la detección de ADN específico por método de PCR [36].

Detección de Genoma de *N. caninum*

Por la acción que posee la enzima polimerasa de copiar fragmentos de ADN es que se pueden obtener grandes cantidades de una secuencia determinada para su visualización y posterior análisis. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba altamente sensible y específica para la detección de ADN de cualquier organismo, en el caso de *N. caninum* se puede utilizar en distintos tejidos o fluidos como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen y leche, entre otros; es decir, puede aplicarse ante mortem y pos mortem. El gen repetitivo específico Nc-5 y el espaciador de transcripción interno (ITS1) generalmente, son los marcadores más utilizados para la detección de *N. caninum* basado en la PCR, como nested- o hemi PCR-NESTED, con el objetivo de mejorar sensibilidad y especificidad [91]. Desde que fueron publicados los primeros protocolos con esta técnica, a lo largo de los años, han sido modificados en muchos laboratorios usando una amplia variedad de iniciadores, haciendo PCR anidado para aumentar la sensibilidad de la prueba para detectar al parásito en infecciones de bajo nivel [105] en este tipo de infecciones la capacidad de detectar al parásito por esta prueba se basa principalmente en la estrategia de muestreo, dado que *N. caninum* tiende a formar quistes tisulares, principalmente en el cerebro [108, 120], por esta razón, suele ser el cerebro (SNC) el tejido más utilizado para el diagnóstico; sin embargo, se reportan hallazgos de ADN del parásito en otros tejidos, como ser en músculo esquelético, corazón, riñón, hígado, médula espinal y pulmón; al respecto, se ha señalado que el utilizar diferentes tejidos y al menos dos muestras de cada uno, aumenta la probabilidad de detectar al parásito [105], obviamente, el principal inconveniente de esto es el uso de tejidos que sólo se pueden obtener posmortem; en este sentido, la búsqueda de alternativas para el diagnóstico antemortem, ha sido variar las opciones a elegir a través del uso de fluidos como leche, calostro, semen y sangre, obteniendo buenos resultados en investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo [132, 241, 264, 279, 280, 282, 393].

El diagnóstico de la neosporosis bovina se puede realizar en el ganado mediante diferentes técnicas serológicas indirectas, como el ELISA y la inmunofluorescencia indirecta, mientras que en los fetos abortados se usan métodos de detección directos, como la histopatología, la inmunohistoquímica y pruebas de PCR, utilizando principalmente cerebro, corazón e hígado, que son los órganos comúnmente más afectados [115], asimismo, se ha informado que mediante PCR es posible detectar ADN del parásito en leucocitos, linfocitos y sangre, lo cual demuestra la presencia del parásito de manera directa en animales vivos con infecciones naturales o experimentales [289]. La eficacia del diagnóstico por PCR depende del laboratorio, la etapa de la autólisis del feto y los procedimientos de muestreo. Aunque la prueba inmunohistoquímica de *N. caninum* en las lesiones es la mejor evidencia de la etiología del aborto en la actualidad, es muy sensible. El ADN de *N. caninum* puede detectarse en tejido del SNC de un feto abortado fijado en formalina e incluido en parafina mediante PCR. *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis cruzi* son otros protozoarios que deben considerarse en el diagnóstico diferencial del aborto por protozoos en el ganado, y la detección del ADN por PCR pueden distinguirlos de *N. caninum*. El *Sarcocystis cruzi* forma esquizontes en el endotelio vascular y rara vez (<0.1%) se encuentra en el cerebro de fetos abortados, mientras que *N. caninum* suele localizarse en tejidos extravasculares. Además, no hay esquizontes inmaduros en la infección por *N. caninum* en contraste con las infecciones por *S. cruzi*. La infección por *T. gondii* en fetos bovinos es rara [82].

Diarrea Viral Bovina

Introducción y breve historia de la enfermedad

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) fue reconocido por primera vez en los Estados Unidos en el año 1946, en animales que presentaban un síndrome agudo caracterizado por fiebre, diarrea, anorexia y tos [20]. En el año 1957, se describió una enfermedad esporádica caracterizada por diarrea profusa, emaciación, ulceraciones en la mucosa del tracto gastrointestinal y mortalidad del 100%. Posteriormente, se determinó que los dos síndromes eran provocados por el mismo virus [20, 255]. A finales de la década del 60 se describieron dos biotipos del virus: el citopático, o cito patogénico, (CP) y el no citopático, o no cito patogénico (NCP), por su habilidad de causar, o no, efecto citopático y muerte celular en cultivos celulares *in vitro*. El Biotipo CP induce destrucción masiva celular mediante la formación de vacuolas citoplasmáticas llevando a la muerte de las células pocos días después de la infección, mientras que el Biotipo NCP no induce ningún efecto aparente en cultivo celular [61].

Los avances en secuenciación genética a finales de los años ochenta permitieron establecer inicialmente dos Genotipos: el 1 y 2, caracterizados por diferencias en la región 5' UTR (untraslate región o región no traducida) y en la región génica que codifica para la proteína E2. El Genotipo 2, que surgió en Norte América y Canadá, se correlaciona con signología hemorrágica y alta mortalidad [315]. De esta manera, en la naturaleza existen 2 Biotipos y 2 Genotipos principales. Recientemente, se ha propuesto la incorporación al género Pestivirus de nuevas especies aisladas a partir de animales salvajes y domésticos. Giraffe Virus, Pronghorn Virus, Bungowannah y Hobi-like [232].

Etiología

El VDVB es un miembro del género Pestivirus de la familia Flaviviridae, junto con el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y la enfermedad de las fronteras en ovinos (EF). Tradicionalmente, el género Pestivirus fue dividido en tres especies, de acuerdo al hospedador a partir del cual se aisló el virus. De acuerdo a ello, el ganado bovino se infecta con VDVB, el ovino con EF y el porcino con VPPC, por lo cual, la nomenclatura asignada a estos virus implica especificidad por el hospedador. Si bien esto puede aceptarse como una generalidad, la visión actual es que los Pestivirus no se encuentran estrictamente restringidos a una especie hospedadora, sino que cruzan fácilmente la barrera de especie. Está ampliamente descrito que diversos Pestivirus adaptados cada uno a un hospedador principal pueden ser transmitidos entre especies hospedadoras, particularmente de bovinos a ovinos, de bovinos y ovinos a porcinos, y de bovinos a rumiantes silvestres [126].

El ovino es el hospedador natural de EF; sin embargo, se han descrito infecciones naturales por EF en bovinos, caprinos, porcinos y algunos animales silvestres [42]. La única especie de Pestivirus no identificada fuera del hospedador natural es VPPC, que aún se encuentra restringida a cerdos domésticos y jabalíes silvestres. Si bien VDVB infecta principalmente al ganado bovino, eventualmente puede infectar ovejas, cerdos, y una considerable gama de rumiantes silvestres entre los que se incluyen representantes de las familias Camelidae, Cervidae, Giraffidae, Antilocapridae, y Bovidae [41].

Estructura viral

El genoma de VDVB es un ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva, no segmentado y posee una longitud de 12,5 kilobases. El virus tiene forma esférica con un diámetro entre 40 a 60 nm y está constituido por una cápside icosaédrica, rodeado de una envoltura lipoproteica tomada de la membrana citoplasmática de las células que infecta [164]. **Fig. 6.**

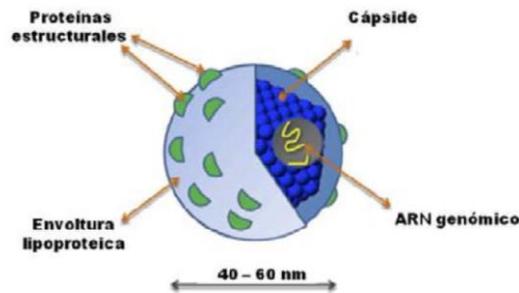


Fig. 6: Representación esquemática del VDVB.

El genoma del VDVB posee un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos, la expresión de la región codificante resulta en una poliproteína que es procesada co y pos traduccionalmente por proteasas virales y celulares, dando origen a las distintas proteínas estructurales y no estructurales del virus: NH₂-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. [93, 127, 361]

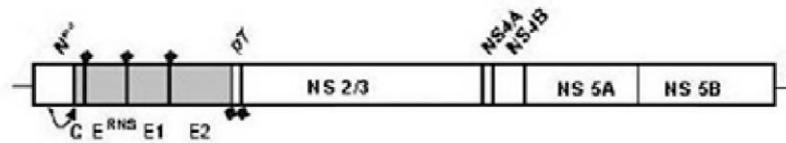


Fig. 7: Representación esquemática del ORF del genoma viral y las proteínas a la que codifica. Fuente: Hellen & de Breyne, 2007. En el extremo 5'UTR hay una secuencia de 370 nucleótidos no codificante, que funciona como un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) que favorece la transcripción de la poliproteína viral, y regulan la traducción y replicación del genoma viral, siendo fundamental en el ciclo del virus. Estos elementos IRES fueron inicialmente identificados dentro del ARN de los Picornavirus, posteriormente se identificaron en otros virus.

La estructura genética de los Picornavirus, especialmente Poliovirus, es similar a la de los pestivirus. La iniciación de la traducción se produce a través de un mecanismo independiente asociado con el IRES en el 5'UTR. Los marcadores de virulencia han sido asignados a bases individuales dentro del IRES de los Pestivirus, es así que las cepas del VDVB de Genotipo 2 son divididas en grupos de alta y de baja virulencia basado en la presencia de dos sustituciones de bases individuales situados en las posiciones 219 y 278 en el dominio D de la región no codificante (**Fig. 8**).

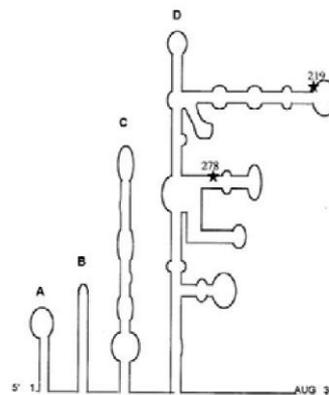


Fig. 8: Representación esquemática de la estructura secundaria del IRES incluido en el 5'UTR del VDVB. Las letras (A, B, C y D) indican los dominios de la estructura y las estrellas los nucleótidos marcadores puntuales de virulencia.

En la posición nucleotídica, 219, las cepas de baja virulencia tienen una citosina y los grupos de alta virulencia presentan un uracilo, mientras que en la posición 278 se observó el revés, una citosina en el grupo de alta virulencia y un uracilo en el grupo de baja virulencia [365].

Proteínas virales

La maduración de las proteínas ocurre por un proceso catalítico co-traducciona l y post-traducciona l a partir de una poliproteína precursora la cual da origen entre 11 a 12 proteínas dependiendo el Biotipo CP o NCP (**Fig. 6**). El clivaje de estas proteínas es mediado por proteasas celulares o virales [251].

Proteínas estructurales

La estructura del virión está conformada por la proteína C, la cual empaqueta el ARN genómico y las proteínas Erns, E1 y E2, que se encuentran en la envoltura del virus. La proteína de la envoltura Erns es importante en la infección viral por su interacción con la membrana plasmática; asimismo, esta proteína regula la síntesis de ARN en células infectadas [185, 212]. La glicoproteína E1 forma dímeros con la E2 y esta última es la proteína más importante del virus, debido a que contiene los epítopes que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes posteriores a la infección y a la vacunación, así mismo, esta proteína es una de las responsables de la adhesión viral.

Proteínas no estructurales

El clivaje de estas proteínas es mediado por una proteasa viral NS3. Esta proteasa requiere de NS4A como cofactor para el clivaje [251]. Estas proteínas están involucradas en el proceso de replicación del virus. Entre ellas están la Npro, P7, NS2, NS2-3, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B [205]. La proteína Npro presenta actividad auto proteolítica en el extremo C terminal. La proteína P7 se ha asociado con la proteína estructural E2 en células infectadas, pero se desconoce su función. La NS5B presenta actividad ARN polimerasa dependiente de ARN viral [90]. La proteína NS2-3 presente en los Biotipos CP y NCP, es una de las más importantes debido a que da origen a la proteína NS3 solo presente en los biotipos citopáticos [164], (**Fig. 8**). La NS3, con un peso de 80 KDa, es una proteína multifuncional con actividad de serina, proteinasa, ATPasa y helicasa [3]. Esta proteína viral es altamente inmunogénica en animales infectados por el virus [205].

Replicación viral

El virus presenta tropismo por las células mitóticamente activas como las células epiteliales, los linfocitos y células mononucleares [85]. Se han establecido diferencias en el tropismo celular dependiendo del biotipo actuante. De esta manera, se ha observado que los biotipos NCP tienen tropismo preferentemente a leucocitos, órganos linfoides y

células del tracto respiratorio mientras que los Biotipos CP se restringen más al tracto digestivo. En el proceso de adhesión y penetración de virus a la célula están involucradas las proteínas de la envoltura viral (Erns, E1 y E2), las cuales interactúan entre sí mediante puentes disulfuro formando heterodímeros [212]. Aunque los eventos iniciales del ciclo de infección del VDVB no son bien conocidos [184], se ha demostrado que la adhesión y entrada viral se lleva a cabo en dos pasos [193]. El primero consiste en la interacción o unión de la Erns con un receptor de la superficie celular desconocido y el segundo en la interacción de la E2 con una molécula más específica en la superficie, necesaria para mediar la penetración de las células [184, 193]. Se han identificado varias proteínas de superficie como receptores para los Pestivirus, pero ninguna ha sido bien caracterizada. Mediante el empleo de anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra las dos proteínas de la envoltura implicadas en el proceso de adhesión y penetración, se ha evidenciado que los glicosaminoglicanos (GAGs) de la superficie celular pueden servir como receptores para la Erns, y en el caso específico de la E2 se ha observado una proteína de superficie de 50kDa como receptor específico [193]. También se han sugerido otros posibles receptores para la E2 como el receptor de lipoproteína baja densidad (LDL) y una proteína de superficie de unión de actina de 60kDa [193].

Luego de adherirse y penetrar en la célula huésped el virus ingresa al citoplasma por un proceso de endocitosis mediado por pH ácido y libera su genoma. Al liberarse el RNA viral en el citoplasma actúa como un ARNm, éste entra en contacto con los ribosomas en la traducción [184]. El VDVB virus utiliza el retículo endoplásmico de la célula como sitio primario para el procesamiento de proteínas, biogénesis de las glicoproteínas de la envoltura y formación del virión [351]. El ARN viral es traducido en una poliproteína que es posteriormente clivada por enzimas virales y celulares (endoproteasas) en los diversos polipéptidos de las proteínas estructurales y no estructurales, [3]. La replicación del genoma viral se da por la ARN polimerasa dependiente del ARN viral, la cual produce bandas complementarias al genoma, pero de sentido negativo, posteriormente, la polimerasa viral usa esta planilla negativa para sintetizar nuevas moléculas de ARN de cadena positiva para formar nuevos viriones [90, 164]. Cada célula infectada libera entre 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis [164].

Diversidad viral

Los virus ARN como el VDVB son propensos a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones [55]. Esta variabilidad del virus se ha asociado en parte a la ARN polimerasa viral, la cual no corrige los nucleótidos mal incorporados en la replicación viral [164]. Análisis moleculares del genoma del Biotipo CP han establecido

que éstos surgen o evolucionan de los Biotipos NCP. La habilidad de generar mutantes de los virus permitió que puedan adaptarse rápidamente a las respuestas del huésped y en ocasiones establecer la enfermedad crónica o persistente [55]. La recombinación genética puede surgir cuando 2 viriones infectan una misma célula [164]. Los re-arreglos encontrados en los Biotipos CP incluyen: inserciones celulares, duplicaciones o deleciones de la secuencia viral [40]. Se observan en la región del genoma que codifica la proteína NS2-3, donde introducen un sitio de clivaje que genera el procesamiento de la proteína NS2-3 en NS3 [164]. Algunos ejemplos de re-arreglos son la inserción de la secuencia celular de Ubiquitina (Ub) adyacente al extremo N terminal de la NS3, deleciones de secuencias del genoma como la que codifica para la proteína C hasta la NS2, lo que hace que la Npro se fusione directamente con la NS3. Estos re-arreglos generan el clivaje de la proteína NS2-3 por la actividad proteolítica de la Npro [251].

Genotipos virales

En estudios de secuenciación, el VDVB ha sido dividido en dos Genotipos principales: el 1 y el 2 (**Fig. 9**), caracterizados por secuencias diferentes en el ARN principalmente en la región 5' UTR y en las secuencias codificantes para Npro y E2 [373]. El VDVB es endémico en casi todo el mundo, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas [394]. Los genotipos 1 y 2 fueron posteriormente agrupados en sub-genotipos 1a y 1b, y 2a y 2b [318]. Los 2 Genotipos tienen una homología nucleotídica de aproximadamente del 60%, las diferencias se limitan a tres zonas hipervariables, dos de ellas en la región E2 y la otra en la región 5'UTR [319]. El genotipo VDVB-1b es el sub-genotipo predominante en las Américas, Asia y Europa. En cambio, el 95,9% de los aislamientos de campo en Australia fueron clasificados como VDVB-1c [413]. El Genotipo 2 ha presentado mayor prevalencia en Estados Unidos y Canadá, se ha aislado en algunos países de Europa y en América del Sur. Entre estos últimos, se ha aislado en Brasil, Argentina, Chile, Perú, Colombia, entre otros [277, 284, 302, 316, 352, 373]. El VDVB 1 causa, generalmente, fiebre, diarrea, neumonía, lesiones en mucosas y leucopenia. El VDVB 2 se ha asociado con el síndrome hemorrágico caracterizado por la presentación de fiebre alta, leucopenia, trombocitopenia, diarrea y muerte en terneros adultos [315]. Estudios de RT-PCR, amplificando las diferentes regiones del VDVB han permitido identificar también algunos Sub-genotipos [316]. Estos presentan una homología nucleotídica entre el 80 al 85%. En los últimos años se han descrito 21 Sub-genotipos de VDVB 1 y 4 Sub-genotipos del VDVB 2 [134, 268], aunque éstos no han sido reconocidos por el Comité Internacional en Taxonomía de virus (CITV), [316]. Algunos aislamientos obtenidos a partir de suero fetal bovino contaminado, de un búfalo PI en Brasil y bovinos

en Italia e India, ha llevado a sugerir la presencia de un tercer Genotipo, llamado VDVB 3, Hobi like virus o pestivirus atípico [38]. Estos nuevos aislamientos son muy similares a los Genotipo 1 y 2 del VDVB de acuerdo con su homología con las regiones del genoma: 5'UTR, Npro y E2 [224]. Hasta ahora no se ha aislado el VDVB-3 en Argentina. Sin embargo, a partir de muestras bubalinas del noreste argentino se ha encontrado evidencia serológica de la circulación de esta variante viral [295].

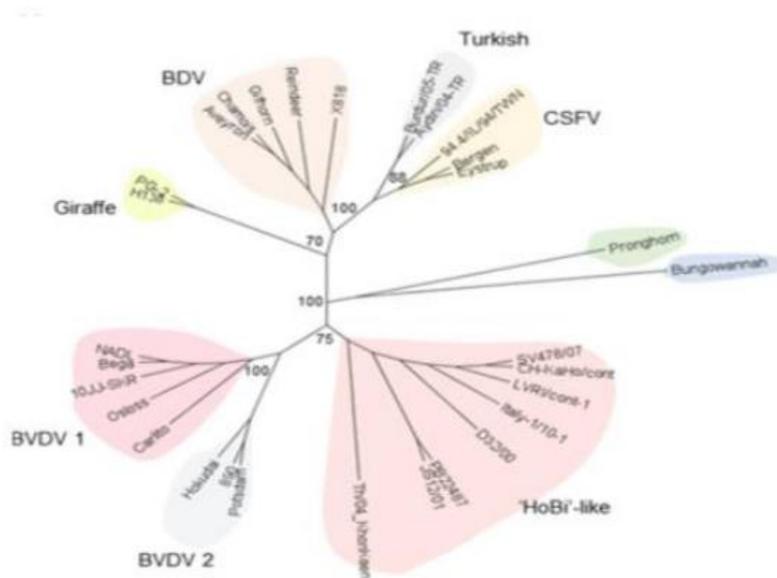


Fig. 9: Árbol filogenético del 5'UTR del género Pestivirus. Fuente: Mósená et al. 2017 [263].

Biotipos virales

El Biotipo CP induce destrucción masiva celular mediante la formación de vacuolas citoplasmáticas con la muerte de las células pocos días después de la infección [44]. La destrucción celular generada por el VDVB se ha asociado con la acumulación de grandes cantidades de ARN viral en la célula, activación de las caspasas iniciadoras (caspasa 9 y 8) por parte de la proteína NS3 y estrés en el retículo endoplásmico al emplearlo en procesamiento de sus proteínas [351]. La infección viral en células MDBK ha revelado la sobreexpresión de ciertas proteínas asociadas al desarrollo de la apoptosis. Entre estas, se destaca la GRP78, una chaperona residente en el retículo endoplásmico cuya expresión se incrementa en respuesta al estrés inducido por la infección. Asimismo, se observa la activación de PERK, un monómero inactivo en condiciones celulares normales, que, ante situaciones de estrés, experimenta dimerización y fosforilación del sustrato eIF2 α (factor 2 de iniciación). Este factor de iniciación induce la transcripción del factor de transcripción nuclear CHOP/GADD153, el cual tiene efectos directos al disminuir la

expresión del gen antiapoptótico Bcl-2. Esta cascada de eventos no se evidencia en los cultivos infectados con biotipos no citopáticos [351]. El Biotipo NCP prevalece más en la naturaleza. Se ha establecido que algunos virus como mecanismo de evasión contra el sistema inmune del organismo suprimen una de las respuestas más comunes ante una infección viral: la apoptosis. Se cree que este mecanismo es por la capacidad de inhibir la vía de las caspasas. En el caso de los biotipos NCP del VDVB se ha observado una sobreexpresión del gen anti apoptótico Bcl-2 [44, 323].

Además de observar diferencias entre los Biotipos en cultivo, también se evidenció diferencias en la respuesta inmune del huésped infectado. Entre estas diferencias está la producción de interferón (IFN) por parte del organismo. Una vez que entra al huésped, el VDVB CP induce la producción de IFN- α , a diferencia del biotipo NCP, que parece inhibir la producción de este [58]. Este bloqueo en la producción de IFN por parte del Biotipo NCP es una de las hipótesis en la generación de animales persistentemente infectados (PI) [85, 337]

Respuesta inmune frente a VDVB

Inmunidad innata

El VDVB infecta una diversidad de células del sistema inmune innato: macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas [86, 149, 300]. Los efectos ante la infección de células presentadoras de antígenos (CPA) dependen de la célula infectada, monocitos y células dendríticas pueden infectarse por el virus y derivarse en una progenie de este, pero solo los monocitos son lisados por cepas CP [87]. El efecto inmunoregulador que ejerce la infección del virus en el sistema innato y posterior presentación antigénica es multifactorial, afectando la presentación antigénica a través de la supresión de correceptores y activación de la presentación mediante el CMH II llevando a una anergia en la respuesta celular [87]. También está descrito que la infección de macrófagos alveolares provoca una reducción en la capacidad fagocítica, microbicida y quimiotáctica, y una reducción también en la expresión de receptores Fc y del complemento [381]. Al mismo tiempo, la infección de macrófagos con VDVB CP o NCP inducen una caída en la producción de anión superóxido y de TNF- α en respuesta al LPS [1]. Todos estos efectos contribuyen a la inmunosupresión ocasionada por el virus.

Los interferones de tipo I (α y β) son las citoquinas antivirales más importantes de la inmunidad innata. El tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con IFN- α , previene la replicación *in vitro* de VDVB (CP y NCP) [341]. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que la capacidad del IFN- α de inhibir la replicación viral sólo ocurre cuando es administrada antes de la infección, mientras que es incapaz de hacerlo

cuando es administrada posteriormente [336]. En este último caso, el IFN- α sí fue capaz de montar un estado antiviral para prevenir infecciones secundarias contra virus o no relacionados.

Inmunidad Celular

El VDVB provoca linfopenia, que puede ser moderada o severa de acuerdo a la virulencia de la cepa involucrada en la infección, a su vez, se ha reportado depleción de células T CD4+ y CD8+ en el timo y en el bazo de animales infectados [63, 86]. Ello plantea el interrogante sobre la importancia de cada subpoblación linfocitaria en la respuesta frente a la infección. Se sabe que la depleción de células T CD4+ incrementa el período de eliminación viral, mientras que la depleción de células T CD8+ no provoca una alteración de este tipo, demostrando que las células T CD4+ juegan un rol preponderante en la inmunidad contra VDVB. Las células T CD4+ son importantes en la coordinación de una respuesta celular que ocurre tempranamente durante una infección. Las respuestas se dirigen contra las proteínas NS3 y E2 [92, 208]. No obstante, es importante aclarar que la inmunosupresión causada por el VDVB está ligada a factores relacionados con el hospedador y con la virulencia, el biotipo y genotipo de la cepa implicada en la infección. Es por esto que la descripción del efecto regulador que genera el VDVB al sistema inmunológico bovino es sumamente compleja.

Inmunidad humoral

La inmunidad humoral, pasiva y activa contra el VDVB, es protectora. Luego de una infección aguda los anticuerpos contra el VDVB son detectados a las 2 a 3 semanas y pueden llegar a su título máximo entre las 10 a 12 semanas post infección [182].

La capacidad de los anticuerpos para proteger durante una infección del VDVB depende de la cepa viral y el isotipo de los anticuerpos producidos. Existe correlación entre la inducción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes y la protección frente al desafío con una cepa homóloga [147, 213, 274], e incluso en algunos casos contra cepas heterólogas [165]. A su vez, algunos autores discuten si la correlación en la protección inducida por anticuerpos es alta, o no, en desafíos heterólogos concluyendo que la protección que brinda la vacuna debe establecerse a nivel de rodeo, y no individual, ya que ninguna confiere el 100% de protección [314].

El sistema inmune de los terneros neonatos

El sistema inmune de todos los mamíferos comienza a desarrollarse en etapas tempranas de la gestación. El feto es inmunocompetente a múltiples antígenos, siendo capaz de desarrollar respuestas basadas en anticuerpos específicos [18, 59, 96] .

En los bovinos, no existe transferencia transplacentaria de anticuerpos, por lo que los terneros neonatos nacen agammablobulinémicos. Por ello, dependen de modo crítico de la transferencia pasiva de anticuerpos y otras moléculas bioactivas por parte de sus madres a través del calostro. El ternero presenta una permeabilidad intestinal inusualmente elevada durante las primeras horas de vida, fundamentalmente basada en procesos de pinocitosis de las macromoléculas. Este fenómeno permite absorber y transferir con mejor eficiencia los componentes nutricionales del calostro a través de las células epiteliales y hacia la linfa, desde donde entrarán en sangre vía el conducto torácico. El pico de absorción ocurre en las primeras 4 horas de vida y alrededor de las 48 horas de vida ya se habrá producido la denominada “clausura intestinal”, poniéndole fin a este proceso [379]. Por lo tanto, el recién nacido depende en gran medida de la transferencia de Ac maternos presentes en el calostro (inmunidad pasiva), para protegerse frente a los agentes infecciosos presentes en el medio, tales como virus y bacterias [28, 96, 131, 290].

Presentación de la enfermedad infecciosa

El VDVB produce un amplio rango de manifestaciones clínicas que afectan los sistemas respiratorio, reproductivo, inmune y entérico del bovino [21]. Como resultado de la interacción de diferentes factores: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes [46]. La infección del ganado con el VDVB puede resultar en uno de los tres síndromes definidos para la enfermedad: Diarrea Viral Bovina (o infección postnatal primaria), infección fetal (con posibilidad de generar un animal persistentemente infectado (PI) y la enfermedad de las mucosas, de alta mortalidad [303]. La infección primaria por VDVB puede manifestarse como brotes que afectan un gran número de animales o presentar una baja incidencia continua de casos en rodeos infectados endémicamente. Ambos patrones de enfermedad provocan un fuerte impacto sobre la productividad de las poblaciones bovinas afectadas [179].

En bovinos, las manifestaciones clínicas de la infección por VDVB pueden agruparse en: 1) Infección aguda, 2) Infección congénita, 3) Infección crónica, y 4) Enfermedad de las mucosas.

Modo de transmisión

La transmisión horizontal ocurre por el contacto directo de las secreciones o excreciones de animales con infección aguda o PI con animales sanos. El contacto indirecto ocurre mediante el empleo de agujas o implementos veterinarios, transmisión iatrogénica o fómites [253]. La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación donde el virus atraviesa la placenta e infecta el feto [180].

Infección Aguda

Es la forma clásica de la enfermedad. El animal se puede infectar con un biotipo CP o NCP, encontrando con mayor frecuencia infecciones con el biotipo NCP (90%) y desarrollar una forma de presentación respiratoria, digestiva o reproductiva. Puede resultar en infección subclínica o enfermedad severa con alta mortalidad que puede acompañarse con trombocitopenia y diátesis hemorrágica, dependiendo del genotipo del virus actuante [377]. La enfermedad respiratoria puede ser una de las manifestaciones de la infección generalizada por VDVB [303], no obstante, se ha asociado al Sub-genotipo 1b a este tipo de infecciones [140]. El tropismo de este virus por el sistema inmunológico al infectar las células blancas y causar depleción de linfocitos B y T circulantes, resulta en una inmunosupresión que favorece la infección con otros patógenos [86]. Existe evidencia epidemiológica y experimental de que el VDVB está directamente asociado con el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) [303] interactuando con patógenos como Parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3), Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), Coronavirus, rotavirus, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, etc.

Infección Congénita

La infección en el feto por VDVB depende del momento de la exposición al virus durante la preñez y está asociada con la diseminación transplacentaria del virus durante la viremia. Si la infección fetal ocurre de 0 a 45 días de gestación, puede haber muerte embrionaria; una infección del día 45 al día 175, conlleva a aborto, inmunotolerancia y defectos congénitos. Si la infección ocurre entre los días 125 y 285, puede causar aborto y nacimiento de terneros débiles, aunque también suelen nacer terneros normales con anticuerpos neutralizantes pre-calostrales contra VDVB [344]. El antígeno viral no estructural NS3, luego de la infección de hembras gestantes se ha detectado en el útero, placentomas, membranas placentarias y órganos fetales [138]. La infección venérea puede ocurrir al emplearse toros infectados de forma aguda o persistentemente infectados, con infección testicular persistente [145, 268]. La contaminación del semen

con VDVB se produce porque el virus se replica en la vesícula seminal y la glándula prostática. El semen infectado presenta disminución de la motilidad espermática y aumento en el porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides [153, 344].

Infección Persistente

Los animales PI son producto de la infección transplacentaria durante la gestación entre los 35 a 125 días. Se cree que el requisito para la generación de la persistencia es la exposición al virus cuando el sistema inmune del feto está en desarrollo (35 -125 días). Este cuadro está asociado con la infección con Biotipos NCP y estos animales se convierten en los principales diseminadores de la enfermedad [75]. Los animales PI son inmunotolerantes a los virus homólogos del VDVB; sin embargo, resultan inmunocompetentes a las cepas heterólogas del VDVB y también a otros agentes infecciosos como IBR, PI-3, entre otros [210]. Se ha evaluado la diversidad genética del virus en terneros PI luego del desafío de vacas preñadas, encontrándose una divergencia en la secuencia que codifica la proteína E2 de 0,65%; debido a estas variaciones encontradas se ha establecido que el ambiente uterino y la placenta pueden favorecer la generación de variaciones en la secuencia del VDVB [68]. En los animales PI el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune [331]. Los animales PI suelen eliminar grandes cantidades de virus durante su vida en todos sus fluidos corporales, y representan el medio principal por el que el virus se introduce en los rebaños, y luego se propaga dentro de ellos [62, 179]. 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 [242, 362].

Enfermedad de las mucosas

La enfermedad de las mucosas es una forma esporádica y poco frecuente de la infección por VDVB, descrita en animales PI sobre infectados con el Biotipo CP [65]. La presencia del biotipo CP puede ser externa por sobreinfección con biotipos CP homólogos [67]. Pero, lo más usual es que ocurran reordenamientos moleculares en la cepa NCP persistente (deleciones, inserciones, duplicaciones de secuencias virales, e inserciones de secuencias del hospedador), originando así la cepa CP. La enfermedad presenta signos clínicos severos, baja morbilidad y una letalidad cercana al 100%; esta puede presentar un curso agudo o crónico, dependiendo de la homología entre el VDVB NCP y

CP que afecta determinado animal. La EM se caracteriza por presentar severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones de todo el aparato digestivo [21].

Síndrome hemorrágico

Este síndrome se ha asociado a cepas del Genotipo 2. Este Genotipo ha causado altas tasas de mortalidad en los últimos años [315]. Este tipo de presentaciones clínicas son atribuidas a cepas de alta virulencia del Genotipo 2 mientras que las cepas de baja virulencia pueden presentar una signología aguda leve o asintomática [277]. Clínicamente el síndrome hemorrágico producido por el VDVB se caracteriza por fiebre, marcada trombocitopenia producto de la diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias y equimosis con focos hemorrágicos en las superficies de las mucosas con sangrado en los sitios de inyección [94].

Epidemiología

El VDVB es el agente etiológico causal de la enfermedad infecciosa en ganado bovino más extendida en el mundo. Mencionado anteriormente, el VDVB posee dos genotipos principales (VDVB- 1 y VDVB- 2) y dos biotipos según su efecto en cultivos celulares (CP y NCP).

Los Pestivirus se caracterizan por atravesar la barrera entre especies; de esta manera, se ha aislado de rumiantes domésticos y salvajes como el ñu, búfalo, llamas, alpacas y jirafas [313]. El principal reservorio y fuente de infección del VDVB es el animal PI, que elimina grandes cantidades de virus en todas sus secreciones y excreciones corporales como saliva, semen, leche y secreciones nasales [180, 331]. Los animales con infección aguda también son una fuente de infección, ya que excretan el virus desde las 24 horas post-infección hasta varias semanas post infección dependiendo de la virulencia del virus [20].

Con relación a la prevalencia de la infección, esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas [179].

Distribución mundial y en la Argentina

La infección por VDVB es endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Encuestas realizadas en varios países describieron rangos de seropositividad de 60-80% y presencia del 0,5-2% de animales PI [179]. En todos los países donde se realizaron estudios de prevalencia sobre poblaciones bovinas no vacunadas, se han detectado

anticuerpos contra VDVB [142, 180, 330, 396]. Asumiendo que la presencia de anticuerpos refleja la exposición al virus, se puede concluir que VDVB está distribuido en todo el mundo [180].

En Latinoamérica, se describe la circulación de VDVB en países como Brasil, Chile, Colombia, Venezuela, Argentina, Perú, Uruguay entre otros [245, 276, 284, 310, 352].

La infección fetal durante el primer y segundo trimestre de su desarrollo en terneros bovinos susceptibles conlleva a más del 30% de aborto o momificación fetal, pero en aquellos con infección endémica, inclusive con vacunación, la tasa de aborto puede ser alrededor del 7% [325], y se le considera un componente importante del complejo respiratorio bovino [397].

En la Argentina los datos de seroprevalencia son variables. Informan que la situación es similar al resto del mundo, con seroprevalencias mayores del 70 % y una prevalencia de bovinos PI del 1 %. Fueron reportadas seroprevalencias del 90,7 % y 48,6 % en bovinos adultos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en los llanos de La Rioja respectivamente [277]. El porcentaje de bovinos seropositivos de 6 a 12 meses de edad fue de 41,9 %, 25,6 % y 45,6 % para 11 distritos del sudeste de la provincia de Buenos Aires, 7 del sur de Corrientes y 9 de los llanos de La Rioja, respectivamente. Los datos de relevamientos realizados en la provincia de Jujuy en el año 2011 muestran que el 91% de los establecimientos relevados (cría y leche) resultaron positivos al VDVB [240]. En el año 2012 un relevamiento realizado en rodeos de cría (n= 530 animales) en la provincia de Salta, arrojó una seroprevalencia a VDVB del 68% en la categoría de mayores de 2 años y de 77% para los menores de 24 meses (comunicación interna). También se señala que, en nuestro país existe una seroprevalencia del 32 % al 100 % en distintos rodeos de cría en las provincias de Neuquén, Chubut, Buenos Aires y la región del Noreste argentino [296].

A partir del primer hallazgo serológico, varias encuestas serológicas realizadas en las regiones de pradera Pampeana y Mesopotamia, arrojaron valores de prevalencia del 41-61,8% [203, 330]. Aunque no se cuenta con un análisis exhaustivo a nivel país, estos datos indicarían que la situación epidemiológica no diferirá de otras regiones endémicamente infectadas del mundo. El genotipo más reportado a nivel mundial es el 1b, seguido del 1a y 1c [394]. Considerando los continentes de manera individual, VDVB-1b es el sub-genotipo predominante en las Américas, Asia y Europa. El 95,9 % de los aislamientos de campo en Australia se clasificaron como VDVB-1c [394]. En Argentina se ha reportado VDVB tipo 1 y tipo 2 en un trabajo realizado sobre 29 aislamientos del VDVB, en el que el 90% correspondieron al tipo 1 y el 10% al tipo 2 [196]. Se reportó una alta circulación del Sub-genotipo 1b dentro del tipo 1 a partir de aislamientos obtenidos en los últimos 15 años en la región pampeana [294].

Estos datos indicarían la presencia de la enfermedad en nuestro país, endémica en algunas regiones.

Impacto económico (industria ganadera y biológicos)

En el contexto del VDVB, se deben considerar muchos criterios para evaluar el impacto de la infección en un rodeo. La existencia de animales infectados puede ser un buen índice para determinar la ocurrencia de la enfermedad en la población; aun así, el amplio espectro de manifestaciones clínicas debe ser considerado a la hora de estimar el real impacto económico. Las estimaciones de las pérdidas que provoca la infección por el VDVB sobre la industria ganadera varían significativamente según distintos autores, y en la mayoría de los casos, los cálculos sólo incluyen pérdidas directas, por lo que deben ser consideradas estimaciones de carácter conservador. Según el tipo de establecimiento, el VDVB impacta de distintas maneras en los rodeos:

- Tambo: el VDVB reduce todos los índices reproductivos, pero en este caso el eje del problema no es el aborto en sí, sino la disminución de la producción futura de leche. Para el año 2013, se calculaba una pérdida de \$156 ± 51,49 por vaca lechera en su ciclo anual reproductivo [326].
- Feedlot: en estos establecimientos, dado la corta duración del ciclo productivo, el mayor impacto se describe en la disminución de ganancia de peso de los animales que cursan con la infección clínica o subclínica. Se calcula una pérdida promedio de 140 g/día/animal, considerando una ganancia promedio de 1200 g/día/animal (Cámara Argentina de Feedlot, 2016). El ingreso de animales de diferentes orígenes al feedlot, el estrés asociado a un cambio de dieta abrupto y el hacinamiento, entre otras variables de manejo, generan un escenario ideal para la diseminación del VDVB. Los animales que se infectan con VDVB y que sufren la inmunosupresión concomitante, presentan un mayor riesgo de desarrollar infecciones por patógenos bacterianos de las vías respiratorias. De este modo, el complejo respiratorio bovino se presenta clínicamente, lo cual suele requerir tratamiento con antimicrobianos, sumándose el costo de estos a las pérdidas económicas. En este tipo de establecimientos en particular, se ha comprobado que las pérdidas generadas por el VDVB disminuyen dramáticamente cuando los animales que ingresan han sido vacunados previamente a ser transportados al establecimiento (se recomienda vacunar tres semanas previas al transporte), esta práctica promueve que los bovinos monten una respuesta inmune eficiente antes de ser expuestos al virus [316]. Desafortunadamente la práctica habitual en una gran cantidad de establecimientos de nuestro medio, contrariamente a esta

recomendación, opta por inmunizar a los animales cuando llegan al feedlot, reduciendo notoriamente la utilidad de la vacunación contra el VDVB.

- Cría: el VDVB impacta sobre todo en los parámetros reproductivos del rodeo y disminuye la ganancia de peso de los animales enfermos. En el caso de establecimientos que realicen reposición con la compra de animales, los animales que ingresan al establecimiento deberían ser controlados por VDVB para descartar que sean PI, siendo recomendable que permanezcan apartados del resto del rodeo (cuarentena) hasta obtener los resultados confirmatorios de laboratorio.
- Establecimientos de reproductores: el semen es una fuente de contaminación con VDVB [145], por ese motivo los toros deben ser indefectiblemente controlados. En el sistema reproductivo de los toros, el VDVB puede generar una infección transitoria o quedar alojado en los testículos de manera persistente, diseminando el virus a través de semen de forma intermitente o durante toda su vida. En los establecimientos reproductores, las pérdidas económicas asociadas al VDVB también están dadas por los problemas gestacionales causados por el virus. Pero, fundamentalmente, el impacto está dado por las restricciones al comercio del semen ya que tanto la normativa internacional como regional requieren la ausencia de VDVB o de su material genético en las partidas de semen para exportación (Resolución Mercosur 32/14).

El indiscutible y comprobado impacto económico de la DVB en los distintos tipos de establecimientos ha llevado a varias regiones del mundo a iniciar planes de erradicación, que en algunos casos han funcionado y en otros están aún en desarrollo. Estos planes, en algunos casos voluntarios y en otros obligatorios, se han basado y se basan en la eliminación de los animales PI, acompañado o no de vacunación según el caso [364, 383].

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) deprime el sistema inmunológico vacuno, tornando al animal susceptible a muchas otras infecciones. Por ello, el VDVB constituye una de las enfermedades bovinas más costosas del mundo, con pérdidas de \$10-\$88 (€10-€60) por cabeza debido a la reducción de la productividad, salud y eficiencia reproductiva del ganado.

La naturaleza insidiosa del virus ha provocado grandes pérdidas económicas de origen reproductivo, reflejadas en leche y carne. Estas pérdidas se relacionan con el aumento en el número de días abiertos, abortos, disminución en la calidad de semen, así como en los costos de tratamiento en animales enfermos y en las pérdidas en producción [179, 369]. La cuantificación de pérdidas económicas frente a la infección con VDVB en hatos lecheros en Europa se ha calculado entre 13-160 € por vaca al año dependiendo del tipo de presentación de la enfermedad [136]. Las pérdidas se pueden incrementar cuando el VDVB se combina con otros patógenos como los del complejo respiratorio [159].

Los efectos negativos que provoca la infección por VDVB incluyen: mayor mortalidad entre animales jóvenes, retraso del crecimiento, reducción en la producción de leche y de la performance reproductiva, mayor predisposición a otras enfermedades.

Las pérdidas que provoca la infección por VDVB sobre la industria ganadera se estiman entre 10 y 40 millones de dólares (U\$S) por millón de cabezas de ganado según estudios económicos realizados en varios países [136, 170, 214]. En Argentina, las pérdidas económicas asociadas al VDVB también son muy importantes: estudios recientes indican que sólo en concepto de abortos se pierden \$302 millones anualmente debido a venta y reposición de vientres abortados y \$463.680.000 en concepto de lucro cesante por menor producción de terneros (Odeón, 2013, no publicado); sin tener en cuenta mermas por infertilidad y mortalidad embrionaria; cuadros de diarrea, enfermedad respiratoria, enfermedad de las mucosas, utilización de semen contaminado, inmunosupresión, etc. Recientemente, fue publicado otro estudio, que las pérdidas económicas en Argentina asociadas al VDVB y a IBR que ascienden a más de \$812.000.000 por año, cuyo impacto se produce en el sector de cría, en tambo y también en feedlot. El impacto económico refleja la importancia de la enfermedad. El VDVB es un contaminante común del suero fetal bovino (SFB) y de cultivos celulares de origen bovino [231, 318, 357]. El SFB, es utilizado para suplementar medios de crecimiento de cultivos celulares para uso diagnóstico o de investigación, y también para la manufactura de productos biológicos tales como vacunas. La contaminación por Pestivirus conlleva serias implicancias en cuanto a la bioseguridad de los productos biológicos, incluyendo vacunas, reactivos y kits de diagnóstico, células madre y otros productos de la bioindustria. En una campaña de vacunación contra IBR realizada en Holanda, se distribuyó VDVB 2 virulento como contaminante de la vacuna, causando alta morbilidad y mortalidad [22]. En Argentina, se ha determinado que el 25% de los cultivos celulares primarios y el 22% de los fetos bovinos aparentemente sanos están infectados con Pestivirus [265], mientras que el 80% de los lotes de SFB crudo y manufacturado, tanto de origen nacional como importado, resultaron positivos para el virus [396].

Diagnóstico

Detección viral

La presencia de VDVB en una muestra puede demostrarse mediante aislamiento y detección en cultivo celular, detección de antígeno o de ácido nucleico viral [142, 181, 330]. El aislamiento viral es la técnica de referencia del diagnóstico virológico, considerado el método 100% específico y altamente sensible. Aunque su utilización se encuentra

limitada por la complejidad de sus requerimientos, principalmente relacionados al uso de líneas celulares, demanda de personal especializado y un continuo análisis de los insumos (líneas celulares y sueros) que asegure su condición de libre de contaminación por Pestivirus. Además, el resultado se obtiene al cabo de días y a costos relativamente elevados. Por este motivo no suele ser empleado su uso en el diagnóstico de animales PI en un programa de control y erradicación [121]. El cultivo celular se ha optimizado con el sistema microtiter multi-well, donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de suero problema e incubadas por 4 días; la presencia de biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti-VDVB marcados con peroxidasa o fluorocromos [330]. Estas desventajas propias de la técnica de aislamiento viral constituyen las fortalezas del enzimo-inmuno ensayo (ELISA) para detección de antígeno viral, y el extensivo uso de este método se ve reflejado en el gran número de ELISAs desarrollados [281, 398]. Para la detección de antígeno viral intracelular en muestras de tejido, la técnica de elección es la inmunohistoquímica [171] en la que se destaca la utilización de biopsias de epitelio auricular para el screening de bovinos PI [273].

La detección de antígeno mediante ELISA se ha convertido en un método muy utilizado para la detección de animales PI a nivel individual. Estas pruebas no se usan para detectar animales infectados de manera aguda (aunque en ocasiones esto pueda lograrse). Es importante destacar que estas pruebas no están diseñadas para analizar semen ni materiales biológicos que se empleen en las pruebas o en la fabricación de vacunas. Se han publicado varios métodos de ELISA para la detección de antígeno y existen a la venta varios kits comerciales. La mayoría se basan en el principio del ELISA de tipo sándwich, con un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y un anticuerpo detector conjugado a un sistema de señal, como la peroxidasa. En el sistema de detección, a veces se incluyen pasos de amplificación para aumentar la sensibilidad de la prueba, como el uso de biotina y estreptavidina.

Se han descrito sistemas basados tanto en anticuerpos monoclonales como en anticuerpos policlonales. Esta prueba mide el antígeno del VDVB (NS2-3 o ERNS) que se encuentra presente en lisados de leucocitos de sangre periférica; los ELISA de captura de antígeno de nueva generación (ELISA de captura de ERNS) permiten detectar antígeno del VDVB en sangre, así como en plasma o en suero. El mejor método proporciona una sensibilidad similar a la del aislamiento del virus, y puede ser preferible en los contados casos en los que una infección persistente cursa con seropositividad. Debido a la viremia transitoria, el ELISA de detección de antígeno es menos útil para la detección del virus en las infecciones agudas por el VDVB. El ELISA de detección del antígeno NS2-3 puede ser menos efectivo en terneros de corta edad que hayan tomado calostro, debido a la presencia de anticuerpos maternos contra el VDVB. La RT-PCR en tiempo real

probablemente sea el método de detección más sensible en tales circunstancias, pero el ELISA de detección de ERNS también ha comprobado que es una prueba sensible y fiable, sobre todo con biopsias de piel, muestra de pabellón auricular [95].

Los métodos de aislamiento viral y ELISA para la detección de antígeno viral comparten una desventaja: la interferencia por anticuerpos específicos que pudieran estar presentes en la muestra, por ejemplo, de un animal PI con anticuerpos pasivos maternos circulantes adquiridos por absorción del calostro de una madre seropositiva. En este sentido, la técnica de detección de ARN viral por RT-PCR convencional y qRT-PCR está exenta de dicho problema y presenta una elevada sensibilidad analítica, por lo que resulta un muy buen método de detección [395, 398].

La detección de cepas de VDVB en animales que cursan una infección aguda se basa en el aislamiento del virus o mediante la medición de anticuerpos específicos mediante la prueba de fijación del complemento, ELISA, inmunoperoxidasa y ensayos de inmunofluorescencia [2]. También se han utilizado técnicas moleculares para detectar la presencia de virus en muestras de sangre y suero [20, 23]. La comparación de la RT-PCR con ELISA y las pruebas de inmunoperoxidasa de cultivo celular para la detección de infecciones por pestivirus en rumiantes reveló que la RT-PCR es más sensible que las otras pruebas [173]. Se sugiere monitorear el virus en muestras de semen de toros seronegativos y no virémicos [137].

Detección genoma del VDVB

El ARN viral se puede detectar fácilmente en casi todos los materiales de la muestra. Se debe tener cuidado para garantizar que los cebadores o las sondas utilizadas puedan detectar tanto el VDVB-1 como el -2, incluidos todos los subgrupos genéticos relevantes del virus. En la práctica, esto significa la detección de parte de la 5'-UTR del genoma viral, en la que se encuentran las regiones altamente conservadas. En el ámbito de la detección del genoma viral, se emplean diversos métodos, entre los cuales destacan la retrotranscripción asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que resulta detectable en muestras de suero [375], así como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real [143, 173, 331]. Específicamente, el método de RT-PCR incluye una variante conocida como RT-PCR anidada (RT- nested-PCR). Esta técnica implica, después de la síntesis de cDNA, la amplificación mediante el uso de cebadores previamente diseñados, derivados de la región 5' no traducida, notablemente conservada en el genoma de VDVB. Es importante destacar que estas técnicas están diseñadas para la detección de material genético específico del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)[187].

Detección anticuerpos VDVB

La técnica de referencia utilizada para la detección de anticuerpos anti VDVB es la seroneutralización en cultivo celular. Si bien esta técnica resulta muy específica y sensible, requiere de un laboratorio de diagnóstico de mediana-alta complejidad y resulta económicamente desventajosa para analizar un número alto de muestras [125].

Se han adoptado muchas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra VDVB, incluida la inmunodifusión en gel de agar, la fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta y el Western Blot. La inmunodifusión en gel de agar detecta principalmente anticuerpos contra el antígeno NS2-3, pero dado que la sensibilidad analítica es baja, funciona mejor como un ensayo de detección simple [125]. De manera similar, la sensibilidad analítica de la prueba de fijación del complemento no es muy alta, dado que los anticuerpos detectados con este ensayo aparecen y disminuyen antes que los anticuerpos neutralizantes, pero esta técnica puede usarse para la detección temprana de anticuerpos en animales seroconvertidores [160]. También se describe la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en la que se utilizan como antígeno células infectadas con VDVB fijadas en portaobjetos. En el caso del western blot también es similar a algunos ELISA, pero brinda información sobre la especificidad molecular de los anticuerpos [330].

Se desarrollaron diferentes métodos serológicos para detectar el VDVB de manera simple, eficaz y económica. Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de detectar una amplia variedad de VDVB. Este sistema, comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales [203]. Por otra parte, los sistemas ELISA basados en un anticuerpo monoclonal epitope específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del VDVB [156]. Al abordar ambas problemáticas centrales para el control de la enfermedad, se desarrollaron y evaluaron ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti VDVB en el suero de los bovinos. Los ensayos se diseñaron utilizando cada una de las tres proteínas más inmunogénicas del virus, E0, E2 y NS3, expresadas en el sistema baculovirus / células de insecto. Los ensayos de ELISA demostraron ser altamente sensibles y específicos en la detección de anticuerpos anti VDVB, de manera similar a la neutralización. Más aún, la inclusión de la proteína no estructural NS3 permitió detectar anticuerpos anti VDVB en animales tipificados como negativos en ensayos de seroneutralización [291].

Se pueden detectar anticuerpos contra el VDVB en suero de ganado bovino mediante una neutralización viral (NV) estándar o ELISA, empleando uno de los muchos métodos publicados o con kits comerciales [125]. Se utiliza la serología para detectar niveles de inmunidad del rebaño, para la detección de animales IP en un rebaño, para ayudar en la investigación de una enfermedad reproductiva y de la posible implicación del VDVB y para establecer el estado serológico de toros que se utilicen para la obtención de semen y para determinar si ha habido una infección reciente. El ELISA de detección de anticuerpos en muestras de leche de tanque puede dar una pista útil del estado de un rodeo respecto a la DVB [272]. Un resultado de ELISA alto (0,8 o más unidades de absorbancia) en un rodeo no vacunado indica una probabilidad alta de que tal rodeo haya estado expuesto al VDVB recientemente, probablemente por la presencia de uno o más animales PI. En cambio, un valor muy bajo o negativo ($\leq 0,2$) indica que es improbable que haya animales PI. No obstante, los resultados del ELISA no siempre son un indicador fiable de la presencia de animales PI en las explotaciones, debido a diferencias en el manejo [399], a la administración reciente de una vacuna o a la presencia de antígeno vírico en la leche de tanque, que podría interferir con la prueba de detección de anticuerpos en sí. La determinación de anticuerpos en pocos animales de corta edad (9-18 meses) también se ha utilizado como indicador de transmisión reciente del VDVB en el rebaño [177], pero este método depende del grado de contacto entre grupos de animales del rebaño y de la posible exposición al virus mediante rebaños cercanos. La NV se utiliza más para fines reguladores (como el análisis de donantes de semen), mientras que los ELISA (normalmente en forma de kits comerciales) se suelen utilizar para fines de diagnóstico. Tanto en el ELISA como en la NV deben incluirse en cada ejecución sueros estándar positivo y negativo a modo de controles, y para que estas pruebas se consideren válidas, los resultados de estos controles deberán situarse dentro de los límites predeterminados. En el caso de la NV, en cada análisis de muestra problema también debe incluirse un "suero control" para determinar la toxicidad de la muestra.

Los métodos serológicos se usan principalmente para identificar bovinos con infección aguda. Los ensayos para evaluar anticuerpos específicos permiten detectar indirectamente la ocurrencia reciente de infección aguda, o la presencia de animales PI mediante la respuesta serológica en los animales susceptibles que cohabitan con los PI.

Se emplean dos técnicas para la detección de anticuerpos contra VDVB: seroneutralización (SN) y ELISA. La SN es la técnica de referencia [126], aunque presenta los mismos inconvenientes que el aislamiento viral mencionado previamente. En consecuencia, el ELISA resulta nuevamente la técnica más difundida, para la que se utilizan dos formatos principales: ELISA indirecto y de competición.

Desde la perspectiva del control de VDVB, el objetivo de los métodos diagnósticos debe orientarse a diferenciar rodeos infectados de no infectados y, dentro de los rodeos infectados, diferenciar entre animales PI, inmunes y susceptibles a la infección. Además, los bovinos PI deben ser diferenciados de los animales que cursan una infección aguda. Ante estas posibilidades, se considera necesario mejorar la performance de los tests diagnósticos, así como especificar las limitaciones de los mismos e interpretación de los resultados. La red europea para el control de VDVB considera necesaria la producción de nuevos anticuerpos monoclonales contra VDVB, con el fin de mejorar la capacidad diagnóstica contra el espectro completo de subtipos conocidos hasta el momento [181].

Vacunas contra el VDVB

La definición del estado del bovino y del rodeo respecto a la infección por el VDVB permite proseguir con las acciones necesarias para el control de la enfermedad, ya sean de bioseguridad o de biocontención, tales como la remoción de animales PI, organizar el movimiento de los animales y aumentar la respuesta inmune del hospedador contra el virus mediante la vacunación. El uso de vacunas para proteger contra una enfermedad infecciosa y/o reducir el nivel de infección en una población ha sido la piedra angular de la medicina preventiva por más de un siglo. Sin embargo, la vacunación puede interferir con el diagnóstico, por lo que su utilización en algunos programas de control genera controversias. La idea consensuada es que la vacunación se debe acompañar a la remoción de los animales PI, y se respalda en el hecho de que regiones en donde se utilizó la vacunación como único método de control durante más de 40 años, la incidencia de la infección por el VDVB no ha disminuido. Durante largo tiempo, el propósito de la vacunación contra el VDVB consistía en prevenir los signos clínicos; sin embargo, en términos de control de la infección, lo importante es romper el ciclo infeccioso y prevenir el nacimiento de animales PI, por lo que el objetivo principal es lograr la mejor protección posible del feto.

Las vacunas clásicas contra el VDVB son de dos tipos: a virus vivo atenuado (MLV, del inglés "Modified Live Vaccines") y a virus inactivado. En el primer caso, la cepa vacunal es atenuada con el fin de disminuir o eliminar su virulencia, y debido a que en la mayoría de estas vacunas el virus replica en el hospedador, la respuesta inmune que generan es muy sólida y de buena duración [97, 202]. Las desventajas de las vacunas a virus atenuado incluyen:

- Posibilidad de reversión del virus a formas virulentas [317].
- Si se aplican en forma incorrecta –durante la preñez- pueden causar infección fetal transplacentaria y dar origen a animales PI [281].

- Producir la enfermedad de las mucosas en animales PI vacunados con cepas vacunales CP [43].

Las vacunas inactivadas, son vacunas en las que los virus pierden su capacidad infectiva y replicativa mediante inutilización de su material genético por el tratamiento con productos químicos como la Etilamina Binaria (BEI), la Beta propiolactona, entre otros. Este tipo de vacunas se deben administrar con adyuvantes para alcanzar una mejor respuesta inmune [278]. Son vacunas muy seguras y se pueden administrar en todas las categorías bovinas incluidas vacas en gestación, pero requieren de una inmunización cada 6 meses para mantener los niveles de anticuerpos vacunales [278]. Este tipo de vacunas está inactivado por métodos químicos o físicos, a fin de preservar al máximo su antigenicidad, pero eliminando completamente su infectividad. Comparativamente, las vacunas a virus inactivados son más seguras que aquellas con virus atenuado, pudiendo aplicarse en cualquier momento. En su mayoría, estas vacunas vienen en presentación polivalente junto con otros antígenos virales tales como: IBR (Rinotraqueitis Bovina Infecciosa), PI-3 (Parainfluenza Bovina), BRSV (Virus Sincitial Respiratorio Bovino); así como algunos antígenos bacterianos (*Pasteurella* spp, *Moraxella* spp, entre otros). A pesar de ser más seguras, no están exentas del riesgo de contaminación por Pestivirus. Las vacunas a virus inactivados generan una respuesta inmune más débil y de menor duración, por lo general, deben aplicarse varias dosis para mejorar su eficacia [5]. Por razones de seguridad, la tendencia general en el diseño de vacunas está enfocada al desarrollo de vacunas no-replicativas, en cierto sentido similares a las vacunas clásicas a virus inactivados. Debido a que no utilizan el virus completo, sino algunos antígenos seleccionados, permiten diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente, utilizando métodos de diagnóstico serológico apropiados, y se las refiere como vacunas DIVA (del inglés "Differentiating Infected from Vaccinated Animals") o marcadoras. La aplicación de vacunas marcadoras eficientes o DIVA sería beneficiosa para el éxito de la erradicación en regiones con una alta prevalencia del VDVB para prevenir la infección transplacentaria y permitiría el seguimiento del estado serológico en granjas vacunadas [201]. Entre las vacunas no-replicativas desarrolladas para el VDVB, citaremos:

- Vacunas a subunidad: Se basan principalmente en la expresión de la glicoproteína E2 de VDVB en un sistema heterólogo, como ser baculovirus [273, 400], o células de mamíferos [295, 363].
- Vacunas con vectores virales: Basadas en la utilización de virus recombinantes que presentan al antígeno de interés en el contexto de una infección viral [106].
- Vacunas a ADN: El gen que codifica para la E2 también ha sido ensayado en vacunas a ADN con diferentes grados de éxito, por lo que su optimización está orientada a mejorar la respuesta inmune inducida en el hospedador natural [99].

- Fue descrito recientemente con resultados prometedores una vacuna de marcador quimérico vivo modificado sintético [201].

En Argentina, sólo está autorizado el uso de vacunas a virus inactivado, la inmunogenicidad y eficacia de las vacunas a virus inactivado contra VDVB es complicada por la dificultad de producir el virus con altos títulos en los sistemas convencionales de producción y generalmente incluyen a VDVB en formulaciones polivalentes [150], otros patógenos virales y bacterianos, contra los complejos respiratorio y reproductivo. Como se mencionó previamente, esta clase de vacunas presenta la desventaja de inducir una respuesta inmune relativamente débil y de menor duración, aunque son más seguras que las vacunas a virus vivo atenuado. Este tipo de vacunas (inactivadas) se deben administrar con adyuvantes para alcanzar una mejor respuesta inmune. Son vacunas muy seguras y se pueden administrar en todas las categorías bovinas incluidas vacas preñadas, pero requieren de una inmunización cada 6 meses para mantener los niveles de anticuerpos vacunales [278]. Asimismo, las vacunas disponibles en el mercado local no son evaluadas experimentalmente con el fin de garantizar la inducción de una respuesta inmune protectora en el bovino, por lo que muchas veces no logran la eficacia solicitada por veterinarios y productores. Recientemente, se sugirió el desarrollo y validación de modelos animales alternativos al bovino para evaluar la potencia de vacunas contra VDVB, debido a la alta correlación observada entre bovinos-ovinos y cobayos-bovinos respecto de la respuesta inmune inducida por vacunas experimentales contra VDVB [130].

Modelos de erradicación de VDVB

Hoy en día disponemos de las herramientas técnicas y los conocimientos necesarios para controlar y erradicar el VDVB. Varios estados miembros de la UE han trabajado en planes a gran escala, algunos de los cuales están a punto de finalizar [27, 156, 301, 329, 360]. Tres elementos centrales de tales esquemas han sido la eliminación de animales PI, la implementación de medidas de bioseguridad destinadas a impedir la reintroducción de la infección en rebaños libres y la vigilancia continua para monitorear el progreso de las intervenciones y detectar rápidamente nuevas infecciones. Estos planes, en algunos casos voluntarios y en otros obligatorios, se han basado y se basan en la eliminación de los animales PI, acompañado o no de vacunación según el caso [27, 156, 301, 329, 360].

En los distintos programas de control se suele diagnosticar a los animales PI utilizando RT-PCR o ELISA de antígenos para la detección de genoma o proteínas virales respectivamente. Se utilizan muestras de epitelio auricular o de suero, y todos los resultados positivos son confirmados en un segundo muestreo con una distancia de al menos dos semanas entre sí, para diferenciar animales con infección aguda de los PI. Los

ELISA de antígeno que se han utilizado detectan antígenos conservados entre diferentes variantes virales, como la proteína no-estructural NS3. La medición de anticuerpos para establecer la seroprevalencia suele realizarse contra esta misma proteína. Por otro lado, para la determinación de anticuerpos inducidos por vacunación suele utilizarse la seroneutralización viral contra las cepas virales utilizadas en la vacuna. En Argentina no existen programas de control ni de erradicación del VDVB, a pesar de que su relevancia como causal de abortos está bien establecida.

Modelo de erradicación de VDVB sin vacunación

En regiones donde la seroprevalencia y la densidad poblacional es baja y no se emplean vacunas, la erradicación está basada en: 1) identificación de los rebaños con infección activa; 2) segregación o eliminación de animales PI; y 3) medidas de bioseguridad o mantener rebaños cerrados para evitar la infección de establecimientos libres [64, 180].

El plan de erradicación a nivel nacional que implementaron Noruega, Finlandia, Suecia y Dinamarca provee un marco regulatorio para el control de las rutas de infección, determinación del estatus infeccioso de cada rebaño por examen serológico, por ELISA indirecto, de muestras de leche de tanque y/o de sangre de 5 terneros entre 8 y 12 meses de edad, detección y eliminación de animales PI positivos a un ELISA basado en anticuerpos policlonales para la detección de antígeno en sangre, así como examen serológico anual para mantener el estatus libre de infección [48]. En Dinamarca, la experiencia demostró que un programa de erradicación en áreas de alta prevalencia no pudo ser seguro sin regulaciones oficiales que controlan las vías de transmisión y que coordine la erradicación en todos los rebaños de una región, ya que la principal vía de reintroducción del virus a un rebaño libre fue a través del contacto directo o indirecto con rebaños PI [47].

Modelo de erradicación con vacunación

Las vacunas seguras y eficaces constituyen una medida de bioseguridad adicional, sobre todo en áreas con alta seroprevalencia, donde el riesgo de introducción del VDVB es alto. Para un control eficiente de la enfermedad es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y para el feto; así mismo, que la vacuna proteja contra los dos genotipos de VDVB [197]. El control sistemático con vacunación consiste en la implementación de esquemas de vacunación destinados a la erradicación, cuya descripción simplificada se detalla en la **Fig. 10**. En poblaciones bovinas con alta

prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener el establecimiento cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad, las estrategias de control incluyen: 1) identificación de animales con infección activa; 2) eliminación de animales PI y 3) programa de vacunación en vacas y vaquillas. La vacunación por sí sola no elimina el virus en el ganado y su finalidad es generar protección contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI [64]. Entre los protocolos vacunales empleados se ha sugerido una primo vacunación con una vacuna inactivada y 4 semanas después una revacunación con una vacuna a virus modificado; esto con el fin de generar una eficiente inmunidad humoral y celular, así como también desarrollar protección fetal [254]. La vacunación sistemática contra VDVB es especialmente útil en las etapas iniciales de los programas de control o erradicación, posterior segregación de todos los animales PI.

Este programa se ha desarrollado en países donde el control mediante la eliminación de PI y la implementación de medidas de bioseguridad no fueron suficientes, como es el caso de Alemania [197]. En Alemania, debido a la elevada prevalencia de la infección (más del 80%) y alta densidad animal, la estrategia de control consistió en la identificación y remoción de bovinos PI, mediante la detección de antígeno en sangre por el método ELISA, y la vacunación sistemática de las hembras, además de medidas de higiene y testeo de todo animal que ingrese al rebaño para prevenir la reintroducción del virus. Por este motivo, surge la necesidad de promover mayor educación e información a productores y veterinarios, ya que muchos rebaños no continúan con el programa luego del testeo inicial y eliminación de los bovinos PI [181]. En este país se implementó la vacunación con el fin de prevenir la reintroducción de la enfermedad y el ingreso de animales PI. Con el empleo de vacunas se espera que se reduzcan los signos clínicos asociados con la infección con el VDVB y que estas provean un mejoramiento reproductivo al reducir la tasa de abortos, muertes embrionarias y el nacimiento de terneros PI.

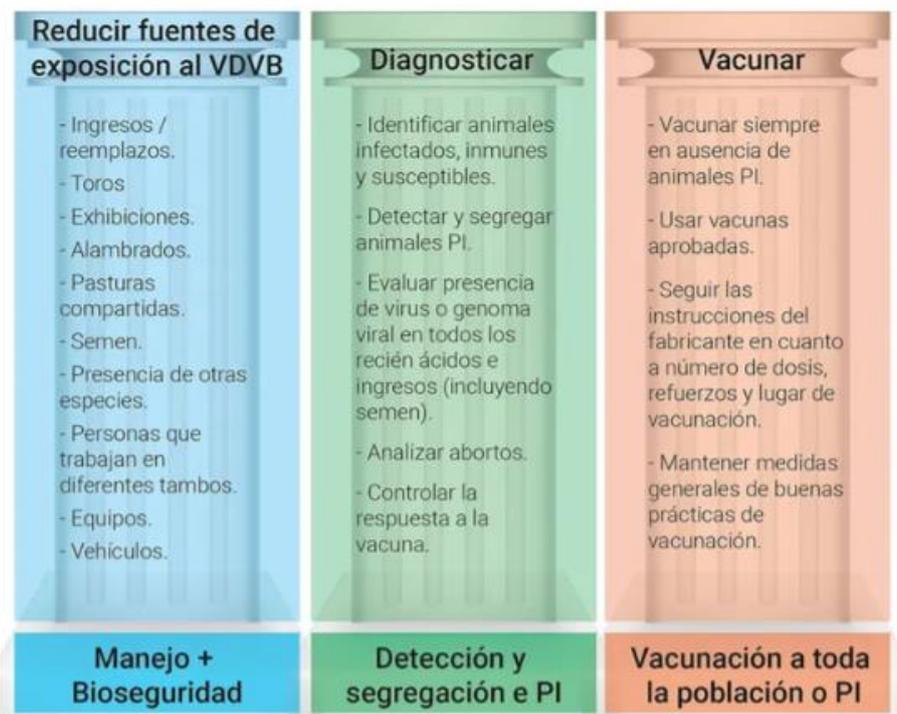


Fig. 10: Representación de los tres pilares del éxito para poder erradicar la circulación del VDVB se fundamentan en: El reducir las principales fuentes de infección (presencia de animales PI, uso de semen contaminado con el virus entre otros), la aplicación y monitorización de diferentes métodos de diagnóstico. La identificación y segregación de animales persistentemente infectados (PI). Por último, sumarle a estos pilares, la aplicación de la vacunación sistemática a toda la población no PI (elaboración propia).

Para el control del VDVB implementando un programa con vacunación sistemática se siguen los siguientes lineamientos (**Tabla 3**).

| Antígeno | Anticuerpos | Vacunación sistemática | Qué indica el resultado | Sugerencias |
|----------|-------------|------------------------|---|---|
| Negativo | Positivo | NO | 1. Este resultado puede indicar circulación viral. 2. Si el animal es menor de 6 meses los Ac pueden ser calostrales. 3. Si es una hembra preñada existe el riesgo de que pueda llevar un ternero PI. | 1. Controle anualmente 2. Repita el ensayo a los 8 meses de vida del animal. Los Ac maternos deben haber desaparecido. Si es así, vacunar. 3. Controlar al ternero. Los PI suelen dar negativos para anticuerpos (pueden tener un bajo nivel de anticuerpos), pueden tener anticuerpos calostrales también, pero los terneros jóvenes deben ser sometidos a pruebas de antígeno de todos modos. |
| Negativo | Positivo | SI | Este animal probablemente posee anticuerpos vacunales | Controle anualmente que este resultado se mantenga. |
| Positivo | Negativo | NO | Este animal está infectado con el virus. Puede cursar una infección aguda o estar infectado persistentemente (PI) | Para confirmar el diagnóstico se debe volver a evaluar 12-20 días después de haber tomado la muestra inicial. En este segundo muestreo si el animal no es PI deben desarrollarse anticuerpos. Segregue a ese animal hasta recibir el resultado. (separarlos de las hembras en servicio). Si no resulta PI, vacune. |
| Positivo | Negativo | SI | Este animal está infectado con el virus. Puede estar transitoriamente infectado y la vacuna no fue eficaz o | Para confirmar el diagnóstico Se debe volver a evaluar 15-20 días después de la muestra de sangre inicial. Segregue a ese animal hasta recibir el resultado (aléjelo de las |

| | | | | |
|--|--|--|---|---|
| | | | bien está infectado persistentemente (PI) | hembras en servicio). Si el animal resulta negativo a antígeno en esta segunda muestra y no tiene anticuerpos, vacune nuevamente y controle a los 21 días |
|--|--|--|---|---|

Tabla 3: Camino diagnóstico para el VDVB empleado junto con un programa de vacunación sistemática (elaboración propia).

Sobre la base del análisis bibliográfico expuesto, podemos afirmar que, a la fecha, no contamos con datos epidemiológicos de *N. caninum* y el virus de la Diarrea Viral Bovina en tambos de la cuenca lechera del Valle de Lerma de la provincia de Salta a pesar del notable crecimiento del stock ganadero en comparación con otras regiones de nuestro país, por lo que estudiar la epidemiología de estos patógenos en esta región redundaría en un mayor crecimiento económico estratégico.

Por otra parte, la respuesta inmune de tipo th1 es conocida por jugar un importante rol en la protección frente a patógenos intracelulares. Este tipo de respuesta por lo general esta disminuida en algunos estadios durante de la preñez, y esta situación se ha relacionado con el aumento de la frecuencia de transmisión vertical [327]. Los estudios sobre la transmisión vertical se basan en modelos experimentales, por lo que la mayoría de la información disponible sobre la respuesta inmunitaria y la prevención de infecciones congénitas se relacionan con la infección aguda. En condiciones naturales, las vacas con infección crónica juegan un rol importante en la persistencia del parásito en el ganado bovino.

Fueron estudiadas a campo las respuestas isotópicas en vacas preñadas que estaban infectadas de manera crónica y que abortaron. Se pudo determinar que la presencia de IFN- γ y valores elevados de anticuerpos IgG2 podrían proteger al ganado vacuno infectado de manera crónica contra el aborto por *N. caninum*. Mientras que en ausencia de IFN- γ , con predominio de anticuerpos IgG2, no aumentaría su protección [10].

En estudios previos, se reportó que la infección transplacentaria estaba asociada a un aumento de títulos de anticuerpos IgG2 anti *N. caninum* [161]. Con lo cual, estudiar el perfil de respuesta inmune en vacas con infección crónica y que no abortaron, en condiciones naturales o a campo, aportaría información valiosa para discernir si el perfil de respuesta inmune se encuentra o no relacionado al aumento de riesgo de infección congénita.

Finalmente, por la existencia de la circulación de VDVB en explotaciones ganaderas de todo el mundo y de nuestro país, no existe un programa nacional para controlar esta enfermedad. Por lo cual, implementar un sistema basado en el diagnóstico y la vacunación en explotaciones bovinas que presentan abortos asociados a VDVB, contribuiría a la mejora en los parámetros productivos y reproductivos. Este trabajo de tesis se enfocó en estas áreas temáticas para generar conocimientos que permitan entender y mejorar la situación sanitaria de los bovinos frente a estas enfermedades.

Hipótesis

- El aumento de la población bovina, la creciente tecnificación y la intensificación son fenómenos responsables del incremento de la circulación de *N. caninum* y del VDVB en los tambos del Valle de Lerma de la provincia de Salta
- La aplicación de una vacuna eficaz, combinada con un diagnóstico preciso y un conocimiento epidemiológico adecuado, permite la reducción de la incidencia de abortos causados por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en bovinos.

Objetivo general

- Caracterizar la epidemiología de *N. caninum* y DVB, en los tambos ubicados en la cuenca lechera del Valle de Lerma en la provincia de Salta y evaluar estrategias de control mediante el uso de una vacuna contra el VDVB.

MATERIALES Y METODOS GENERALES

Animales

Debido la complejidad del diseño de los grupos experimentales utilizados, los mismos se describirán en detalle en cada uno de los capítulos para su mejor comprensión. Todos los procedimientos que involucraron la manipulación, manejo y muestreo de los animales fueron avalados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) protocolo 2017/30, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Virus

Los stocks virales del VDVB se produjeron utilizando monocapa de células MDBK con un 70% de confluencia en botellas plásticas de cultivo celular de 25 cm² "T 25" (Costar, Cambridge, MA, USA). Para las infecciones se utilizó una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,1. El inóculo viral se diluyó en 1 ml de medio MEM-E y luego se incubó a 37°C con movimiento orbital durante una hora para permitir la adsorción del virus a la célula. Posteriormente, se agregó 4 ml de medio de mantenimiento (MEM-E, 2% de SFB) y se incubó el cultivo a 37°C en estufa con 5% CO₂ durante 72 horas. La disrupción de las células remanentes se realizó mediante un ciclo de congelamiento - descongelamiento, seguido de clarificación por centrifugación a 4000 x g a 4°C por 20 min. El sobrenadante se fraccionó y se almacenó para su conservación a -80°C.

Parásitos (Taquizoítos)

Los taquizoítos (2×10^9 /ml) de *N. caninum* (aislado Nc1) se purificaron parcialmente utilizando columnas de Sephadex® (Sephadex™ G-25 Medium, GE Healthcare, Suecia). Después de la centrifugación, la fracción de pellet se trató con ultrasonidos en un baño de hielo y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Los antígenos solubles (sNcAg) se recuperaron del sobrenadante y los antígenos insolubles (iNcAg) se obtuvieron del pellet [238]

Las proteínas en las preparaciones de antígenos solubles (sNcAg) se cuantificaron utilizando un método comercial de ensayo de proteínas (Micro BCA Pierce, Rockford, EE. UU.) como se describió anteriormente [238]. Se prepararon tres lotes diferentes que produjeron 1.67 ± 0.81 µg de sNcAg por 1×10^6 taquizoítos. Los taquizoítos se inactivaron cuando fue necesario, siguiendo un tratamiento de congelación.

Células

La producción y amplificación de las cepas utilizadas de distintos Genotipos del VDVB se realizó en la línea celular MDBK (siglas del inglés para “Madin-Darby Bovine Kidney”). Como medio de mantenimiento se utilizó medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-E (Gibco, Paisley, UK)) adicionado con 2% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A., Argentina) y antibióticos/antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, (Gibco, Paisley, UK). Las células, procedentes del Banco Argentino de Células (ABAC) y medios de cultivo fueron provistos por la Sección de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología, INTA Castelar.

Obtención de muestras

Bovinos

Suero

Para la obtención de los sueros bovinos, se utilizaron tubos y agujas (21G) Vacutainer® (BD) sin anticoagulante que permitieron colectar 5 ml de sangre por animal por venopunción yugular. La muestra obtenida fue transportada al Área de Sanidad Animal IIACS, INTA Cerrillos, Salta. Dichas muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C y luego centrifugadas (3.000 rpm, 10 min). Se separó el suero en 2 alícuotas, que se conservaron a –20 °C hasta su análisis.

Biopsia post mortem

Sistema nervioso central, bazo y placenta

A partir de necropsias realizadas en fetos abortados, se tomó una muestra representativa (biopsia) de sistema nervioso central, bazo y cotiledones de cada animal (1,5 x 1,5 cm aprox) con pinza de mano izquierda o diente de ratón y bisturí N°24 Coronet®, Dichas muestras fueron conservadas a –20 °C hasta su análisis.

Biopsia epitelio auricular

Para la obtención de muestras de epitelio auricular (punta de oreja), previo rasurado, aplicación de 0,5ml de anestesia tópica (Lidocaína, clorhidrato 2%, Richmond Vet Pharma™) y antisepsia (clorhexidina 4%) de la zona a muestrear, se tomó 1 muestra por cada animal de 0,5 x 0,5 cm, se utilizó una pinza de mano izquierda o diente de ratón y bisturí N° 24 Coronet®.

Sueros caninos

Para la obtención de los sueros de los perros, se utilizaron tubos y agujas (21G) Vacutainer® (BD) sin anticoagulante que permitieron colectar 5 ml de sangre de cada

canino por venopunción yugular y en algunos casos a partir de la vena cefálica anti braquial (según grado de agresividad del animal). La muestra obtenida fue transportada al Área de Sanidad Animal IIACS, INTA Cerrillos, Salta. Dichas muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C y luego centrifugadas (3.000 rpm, 10 min). Se separó el suero, y conservó a –20 °C hasta su análisis.

Encuesta epidemiológica en la CVLSa

En el período 2016-2018 se analizaron 16 establecimientos de la cuenca del Valle de Lerma, Salta. Se realizó una encuesta transversal mediante visita a cada tambo. Esta contempló preguntas sobre identificación, manejo productivo, datos sanitarios y presencia de cánidos domésticos o silvestres. La vacuna reproductiva utilizada en algunos de los tambos estudiados está incluida dentro de los planes de vacunación regionales y contiene antígenos del herpesvirus bovino (IBR) tipo 1 y tipo 5, del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), de *Campylobacter sp.*, *Histophilus sp.* y de diversos serovares de *Leptospira sp.*

Tamaño de la muestra en la CVLSa

El tamaño de la muestra se determinó mediante un programa de muestreo estadístico del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (proMESA 1.3, desarrollado por Emilio A León [Unidad de Epidemiología, CICVyA, INTA], Sergio J. Duffy [Unidad de Epidemiología, CICVyA, INTA], Bryan ÓLeary [EpiCentre, Massey University, Nueva Zelanda] y Mark Stevenson [EpiCentre, Massey University, Nueva Zelanda]), considerando una prevalencia esperada de un 40% (estimada a partir de comunicaciones personales con profesionales de INTA), aceptando un error relativo del 20% y una tasa de homogeneidad baja. Se tomaron por cada tambo alrededor de 40 muestras sanguíneas de hembras adultas raza Holando en ordeño, escogidas al azar.

Técnicas serológicas

ELISA para determinación de anticuerpos anti *N. caninum*

La detección en suero de anticuerpos específicos inducidos por la infección se realizó mediante un ELISA indirecto desarrollado en nuestro laboratorio, siguiendo los lineamientos ya establecidos [235]. Brevemente, las placas fueron sensibilizadas (6 h, 4 °C) con un extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc1, 750 ng/pocillo), que fue obtenido siguiendo procedimientos ya reportados [235]. Luego de 3 lavados con solución de lavado (PBS-Tween 0,05%; 250 µl/pocillo), las placas fueron bloqueadas con 125 µl/pocillo de una solución de PBS-caseína al 0,5% (solución bloqueante) durante toda la noche a 4 °C. Los sueros problema se diluyeron 1:120 en solución bloqueante y se

incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (50 µl/pocillo). Luego de 3 lavados, se adicionaron 50 µl/pocillo (dilución 1:5.000 en solución bloqueante) del anticuerpo conjugado (anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa AffiniPure Goat Anti-Bovine IgG [H+L], número de catálogo 101-035-003, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., PA, EE. UU.) Y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. El sustrato (50 µl/pocillo; TMB One Solution, número de catálogo G7431, Promega Biosciences, CA, EE. UU.) Fue agregado luego de unos lavados e incubado en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó la solución de frenado (H₂SO₄ 2N, 50 µl/pocillo) y las placas fueron leídas a 450 nm. Los resultados se calcularon normalizando los valores de densidad óptica (DO) respecto del control positivo (S/P [%]). Se utilizó como control positivo y negativo el suero de un animal infectado y de otro no infectado, respectivamente, caracterizados previamente por inmunofluorescencia indirecta (IFAT, estándar de oro) y por ELISA (ID Screen® *N. caninum* Competition, IDVet, Montpellier, Francia).

Para determinar el punto de corte, se evaluaron muestras positivas (n = 307) y negativas (n = 327) (dilución final 1:120) cuyo status fue definido por IFI. Se construyó una curva ROC y se crearon 2 histogramas; su punto de intersección se consideró como el valor de corte. Se estableció una relación S/P del 40% como un umbral de corte apropiado, pero, dado que se observó cierta superposición entre ambas curvas, las muestras con valores de S/P entre el 30 y el 40% se consideraron dudosas y se procesaron nuevamente en una dilución final de 1:40. El valor de corte de esta prueba confirmatoria fue establecido en el 30% [235].

Para determinar la avidéz de los anticuerpos, se utilizó la misma estructura del ELISA que se describe más arriba y se agregó un paso de lavado de las muestras de suero con un agente caotrópico (urea 6 M en PBS), que despegar anticuerpos débilmente unidos al antígeno antes de agregar el conjugado [235]. Esta solución se incubó en la placa durante 20 min a temperatura ambiente (100 µl/pocillo). Luego, las placas fueron lavadas 3 veces con solución de lavado y se prosiguió con el protocolo, tal como se describió. El grado de disociación obtenido establece la fuerza de unión de los anticuerpos presentes en el suero al antígeno y se estima mediante el índice de avidéz (IA [%]), que se calcula como la relación entre el valor de la DO con el tratamiento con el agente caotrópico y el valor de la DO sin aplicar dicho tratamiento. Se consideran anticuerpos de alta avidéz aquellos que presentan IA superiores al 65% [235].

ELISA Isotipos anti *N. caninum*

Se utilizó la misma plataforma de ELISA descrita anteriormente para titular los diferentes isotipos de IgG, revelando con el conjugado correspondiente: anti-bovino IgM 1:1750, IgG1 1:1000 e IgG2 1:2500 (AbD Serotec, BioRad). Las muestras de suero se

analizaron mediante diluciones en serie dobles a partir de 1:50. Los títulos se expresaron como dilución Log_2-1 alcanzando el valor de corte ($\text{OD} = 0,2$ que corresponde a los valores medios de OD de 50 muestras de suero negativas + 2 SD) [235].

ELISA Interferón- γ

Los niveles de IFN- γ se cuantificaron en muestras de suero individuales utilizando un kit comercial de ELISA (ID Screen® Ruminant IFN- γ -IDVet, Montpellier, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de IFN- γ se estimó a partir de una curva de calibración realizada con una citoquina recombinante provista con el kit (**Fig. 11**).

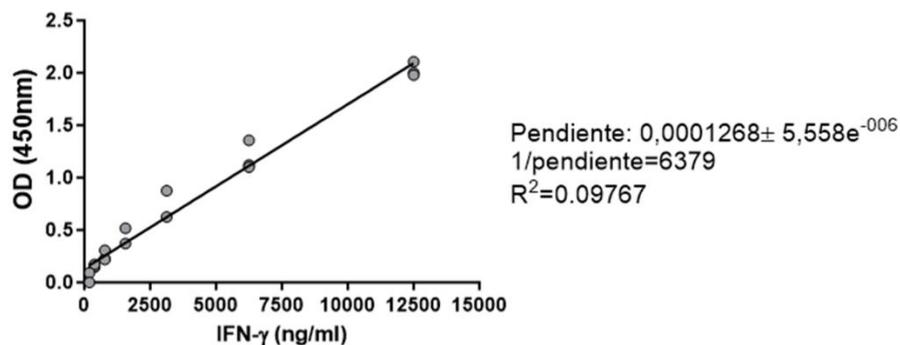


Fig.11: Curva de calibración para medir concentración de IFN- γ . Se generó una curva de calibración para cuantificar la concentración de IFN- γ . Se realizaron triplicados de distintas diluciones de IFN- γ recombinante, y los valores de densidad óptica (OD) se registraron en relación con la concentración correspondiente.

Determinación de anticuerpos anti VDVB

ELISA para detección de anticuerpos contra la proteína no estructural NS3

Se utilizó un ELISA comercial indirecto PrioCHECK™ Bovine VDVB Ab (Thermo-Fisher Scientific). El análisis emplea dos anticuerpos monoclonales (AcM). Los dos AcM reconocen diferentes epítopes localizados en la proteína (P80) no estructural NS3 altamente conservada del VDVB, siguiendo las instrucciones del fabricante.

ELISA para detección de antígenos virales del VDVB

La detección del antígeno viral de VDVB (p80) fue posible a través del uso de un kit comercial, PrioCHECK™ (Bovine VDVB PI focus Ag Strip Kit) cumpliendo con las indicaciones del fabricante y evaluando además la posibilidad de detectar antígeno en suero. El método para la detección de antígenos de VDVB, a partir de este kit, es un ELISA

sándwich que proporciona una señal proporcional a la concentración de antígeno de la muestra. Este test de antígeno detecta VDVB utilizando dos anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen diferentes epítopes en la proteína no estructural NS3 altamente conservada (p80) del VDVB.

Page-Western Blot para detección de anticuerpos anti VDVB

Fueron analizadas por esta técnica, para la identificación de dos proteínas antigénicas de interés, una proteína estructural E2 (p53), presente en animales vacunados contra VDVB y aquellos que estuvieron infectados en algún momento, pero generaron respuesta inmune frente al virus. Y la no estructural NS3 (p80), presente en bovinos que cursan la infección.

El procedimiento de la técnica consistió en la obtención de las proteínas virales correspondientes a la cepa Singer VDVB-1a Cp. Obtenidas con loading buffer reductor 2x, sometidas a agitación durante unos segundos y posterior baño a 100°C durante 5 minutos, luego centrifugación a máxima rpm y recolección del sobrenadante. Posterior realización del gel preparativo se aplicó en un cassette de vidrio (gel separador y apilador) 10 ml de gel separador, seguida descarga de 3 ml de gel apilador. Se utilizó el gel preparativo que contenía 5ul para el marcador de peso molecular (Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder) y 300 ul para la calle con las proteínas virales (stock viral cepa singer VDVB 1a Cp). Se realizó la corrida electroforética a 100 mAmp durante 90 minutos, posteriormente se realizó la transferencia a 20 Voltios durante 35 minutos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare). La transferencia se corroboró con una tinción con rojo Ponceau. Luego la membrana se bloqueó en PBS-Leche 5% durante toda la noche a 4°C.

Las tiras de nitrocelulosa a utilizar para el análisis serológico se incubaron con una dilución 1:50 de un suero control positivo (pool de suero hiperinmune contra el VDVB) y un control negativo (pool de 3 sueros de bovino VDVB negativos del campo experimental de INTA Castelar, terneros provados de calostro) y las muestras problema a evaluar en la misma dilución, se incuban a 37°C con agitación suave durante 90 minutos, posteriormente con 4 lavados con PBS 1x, luego se reveló con un conjugado-peroxidasa anti IgG bovina (Jackson Inmuno research, USA) diluido. 1:1000 y se incubaron nuevamente a 37°C con agitación suave durante 90 minutos, fueron nuevamente sometidas a 4 lavados con PBS 1x, y se reveló con diaminobenzidina (DAB). Se identifican dos bandas principales (fig. 25), una de 80Kd (NS3) y una de 53Kd (E2). Para el se revelado se utilizó DAB (SigmaAldrich, USA)

Detección de genoma de *N. caninum*

Fue empleado el método de PCR-NESTED (NESTED para aumentar sensibilidad). A partir de muestras de sistema nervioso central, bazo y cotiledones, con el objetivo de extraer el ADN del parásito, se empleó un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se cuantificaron por espectrofotometría utilizando NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, US). Se utilizaron taquizoítos de la cepa Nc1 como control positivo y agua libre de ADNsasas como control negativo. La amplificación de la región ITS I (Internal transcribed I) de *N. caninum* [175, 293] llevada a cabo con el tbur de regiones codificantes de oligonucleótidos complementarios al rRNA 16S y del rRNA 5 "8S Los primers empleados se llevaron a una concentración de 10pMol/ul.

Se prepararon diluciones con el ADN de las muestras a analizar de manera tal que la concentración final fue de 1ug/ul.

Por cada reacción de PCR se utilizó 10ul buffer 5x PROMEGA®, 1ul de una solución de dNTPs (10uM cada uno) 1ul de primer 5´TCAACCTTTGAATCCCAA3´ y 1 ul de primer 5´CGAGCCAAGACATCCATT3´ para realizar una primera reacción en termociclador consistente en: a) 94°C por 5 minutos, b) 94°C por 1 minuto, c) 48°C por 1 minuto, d) 72°C por 1 minuto, y vuelve a y b por 25 ciclos. f) 72°C por 5 minutos. Por cada reacción de NESTED se utilizó 10ul buffer 5x PROMEGA®, 1ul de una solución de dNTPs (10uM cada uno) 1ul de primer 5´TACTACTCCCTGTGAGTTTG3´ y 1 ul de primer 5´TCTCTTCCCTCAAACGCT3´ para realizar una reacción en termociclador consistente en: a) 94°C por 5 minutos, b) 94°C por 1 minuto, c) 48°C por 30 segundos, d) 72°C por 30 segundos, y vuelve a y b por 25 ciclos, f) 72°C por 5 minutos. El producto final de la reacción se reveló en un gel de agarosa al 1,8%. Se amplificó la región ITS I (Internal transcribed I) del parasito *N. caninum*. En el primer ciclado se obtuvo un fragmento de 500pb, mientras que en el segundo ciclado (NESTED), el tamaño del fragmento fue de 279pb.

Detección genoma virus de la Diarrea Viral Bovina

A las muestras de suero de bovinos que dieron resultado negativo al ELISA anti VDVB, para identificar posibles PI, se les realizó la retro transcripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT nested- PCR) para detectar presencia de genoma viral (ARN viral). Esta técnica fue utilizada a los sueros negativos y luego se repitió el muestreo a los 21 días para confirmar PI). Brevemente, consistió en realizar la extracción de ARN viral a partir del suero con el uso de TRI Reagent®Sigma-Aldrich, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN viral La concentración de ARN es evaluada con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™). Las relaciones de Absorbancia 260/230 y 260/280 son tenidas en cuenta para evaluar la pureza de las

muestras, considerándose puras aquellas muestras cuyos valores oscilan entre 1,8 - 2,2 y 1,9 - 2,4 respectivamente, luego se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Para la RT-PCR se utiliza la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada tubo de reacción contiene 300 ng de ARN, 400 nM del cebador 326-reverse Pan Pestivirus [374], 0,4 µl de DMSO puro (Sigma Aldrich) y agua de grado molecular hasta un volumen de 15,5 µl. El extremo 5' genómico de VDVB contiene una estructura terciaria en la región IRES que puede obstaculizar la reacción de retro transcripción. Por consiguiente, los reactivos son calentados a 70 °C por 5 minutos e inmediatamente puestos en hielo con el objetivo de desplegar la estructura de ARN. En otro tubo se añaden 0,2 µg de OligoDT (Biodynamics SRL), 400 µM de dNTPs (Promega), 1,6 U de inhibidor de RNAsas (Promega), 4 mM de DTT (Invitrogen), y la enzima Transcriptasa Reversa. De esta mezcla se añaden 8,5 µl al tubo anterior, obteniéndose un volumen final de 25 µl. El tubo es calentado a 42°C por 1 hora y 10 minutos a 94°C para obtener el ADN complementario (ADNc) en un termociclador. Tanto la extracción de ARN y la reacción de RT-PCR es idéntica a la descrita para cuantificación de genoma virales. Para la PCR anidada el ADNc obtenido se utiliza como molde para la primera ronda de la PCR anidada. Cada tubo de reacción contiene dNTPs (Promega) a una concentración de 0,2 mM, 667 nM de cebadores 326-forward y 324-reverse Pan Pestivirus [374], y 2 µl del cDNA previamente obtenido (o agua de grado molecular como control negativo) y la enzima GoTaq® (Promega) según instrucciones del fabricante, en un volumen final de 15 µl. El perfil de ciclado es 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 92°C por 15 segundos, 56°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos finales. El producto amplificado esperado es de 288 pares de bases (pb). La segunda ronda de PCR requiere 2 µl de este producto por reacción, 0,2 mM de dNTPs (Promega), 500 µM de primers Pesti-3 y Pesti-4 [187] y la enzima GoTaq® en un volumen final de 20 µl. El perfil térmico es el siguiente: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos a 92°C por 15 segundos, 58°C por 20 segundos, 72°C por 40 segundos; 72°C por 5 minutos finales). El producto de reacción esperado es de 171 pb y es revelado por corrida electroforética en gel de agarosa (1,5 % en buffer Tris acetato EDTA) utilizando el agente intercalante GelRed™ (Biotium), utilizando 100bp DNA ladder (Promega).

Análisis de secuencias para VDVB

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Secuenciación de INTA para el análisis de secuenciación por el método enzimático de terminación de cadena (Sanger). Las secuencias correspondientes a los genotipos VDVB 1 y VDVB 2 fueron descargadas de genBank (VDVB 1-b: JX848365.1; JX848362.1; JX848361.1; KY040414.1; EU224235.1; KC252585.1; KY040414.1; EU034172.1. Las secuencias correspondientes a la cepa

VDVB 2: U94914.1, aislamiento en Brasil; AF244952.1 aislamiento en Argentina; AB003621.1 y AB003622.1 aislamientos en Asia; U65055.1 y AF026770.1 aislamientos en Europa). Las secuencias fueron alineadas a con el uso del software MEGA7 [204] utilizando el algoritmo clustalW, alineados por parámetros por Default. Se construyó un árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) con 100 replicaciones de bootstrap para el soporte estadístico de las ramas.

Titulación viral

El título de cada stock viral se calculó por el método de Reed y Muench [305]. Para ello se inocularon placas de cultivo de 96 pocillos con monocapa de MDBK con un 70% de confluencia con el virus a titular en diluciones seriadas en base 10. Cada dilución se realizó por cuadruplicado e incubándose durante 72 horas a 37°C en estufa con 5% CO₂.

Vacuna Experimental

Se utilizó una vacuna derivada de una formulación clásica comercial producida por Agropharma Salud Animal S.A. con la siguiente composición antigénica por dosis (títulos por dosis): Herpes virus tipo 1 (BHV-1; 3,03 E+07), VDVB genotipo 1a cepa Singer (3,01E+07), Virus parainfluenza (PI3; 2,2E+07), *Moraxella bovis* (2,2E+08), *Histophilus somni* (1,00E+08), *Mannheimia haemolytica* (1,10E+08) y *Pasteurella multocida* (1,53E+09). El cultivo del VDVB fue inactivado con propiolactona. La vacuna estaba formulada con un adyuvante acuoso "Alupharma" preparado en base a gel de hidróxido de aluminio micronizado, con un Inmunopotenciador® compuesto por polisacáridos y saponina purificada. Los detalles de dosis y composición exactas se encuentran bajo secreto industrial de la empresa Agropharma Salud Animal S.A.

Seroneutralización viral

Se utilizó la técnica tradicional de seroneutralización viral (SN) en placa de 96 pocillos, con virus fijo y suero en diferentes diluciones, en monocapa de células MDBK [142]. Brevemente, una alícuota de los sueros a evaluar, fueron inactivados a 56°C por 30 minutos. Se realizaron diluciones en base 2 de 1:2 hasta 1:512, cada dilución en volumen de 50 µl que luego se mezclaron con 100 DICT50 de la cepa CP 1a Singer. Adicionalmente, se incluyeron controles negativos y positivos de sueros contra el VDVB, control de células MDBK y de las DICT50 incluidas en la prueba. Se adicionaron a cada pocillo que contenía la mezcla de suero/virus 50 µl de suspensión de células en medio de cultivo a una concentración de 150.000 células/ml de medio de cultivo. Las microplacas de 96 pocillos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 días, para posterior

observación directa de la monocapa en un microscopio óptico, facilitado por tinción con cristal violeta. El título de anticuerpos neutralizantes (AN) de los sueros se determinó empleando el método de Reed y Muench [305].

Análisis estadístico

Debido la complejidad del diseño de los grupos experimentales utilizados, el análisis estadístico se describirá en detalle en cada uno de los capítulos para su mejor comprensión. Fueron empleados un análisis estadístico descriptivo, la correlación lineal (Pearson) y la regresión lineal simple, se aplicaron un análisis de varianza. Además, se realizaron análisis de distribución de frecuencias relativas, la asociación entre variables no paramétricas se estimó mediante Odds ratio y se asignó significancia estadística mediante test exacto de Fisher. En todos los casos, el intervalo de confianza (IC) utilizado fue del 95%. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software).

CAPITULO 1

ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGIA DE NEOSPOROSIS EN LA CUENCA LECHERA DEL VALLE DE LERMA EN LA PROVINCIA DE SALTA

Objetivo

- Estudiar la epidemiología de neosporosis en la cuenca lechera del Valle de Lerma en la provincia de Salta utilizando equipos de diagnóstico desarrollados en el laboratorio de Inmunología Veterinaria Aplicada a partir del muestreo de diferentes categorías bovinas según diseño previo.

Materiales y métodos específicos

Toma de muestra y encuesta epidemiológica

Se analizaron en total 16 establecimientos (51,6% del total de tambos de la provincia), se obtuvieron muestras de 693 hembras raza Holando en ordeño (459 vacas y 234 vaquillonas de 2-3 años), lo que significó alrededor de 40 muestras por tambo, asociado a una encuesta transversal mediante visita a cada tambo. Fueron además muestreados 41 perros en algunos de estos establecimientos. Estos animales estaban en contacto con las vacas, ya sea en el campo o en los alrededores de las instalaciones de ordeño.

Se tomaron muestras de tejidos provenientes de fetos bovinos abortados (sistema nervioso central y bazo), y sus envolturas (placenta y cotiledones) siempre que fue posible.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis estadístico descriptivo. Se estimó la prevalencia aparente y real en función de la sensibilidad (0,925) y especificidad (0,968) de la prueba de ELISA utilizada, que había sido desarrollada y validada previamente en nuestro laboratorio mediante un análisis ROC [133, 235].

La correlación lineal (Pearson) y la regresión lineal simple se emplearon para establecer la relación entre seroprevalencia y porcentaje de infecciones crónicas. Se aplicaron un análisis de varianza y un test exacto de Fisher para asociar la presencia de abortos con la seroprevalencia de *N. caninum* y con la proporción de infecciones crónicas y de infecciones agudas. En todos los casos, el intervalo de confianza (IC) utilizado fue del 95%.

Resultados

Sistemas productivos

Los tambos evaluados corresponden a la mitad de los tambos de la provincia (**Fig. 12**). Los resultados de la encuesta realizada en los tambos se resumen en la **tabla 4**. La mayoría de los establecimientos (13/16) tienen un manejo que complementa al pastoreo, con Suplementación (PcS), con maíz molido y silo más heno de alfalfa, soja, semilla de algodón y afrechillo de trigo. Dos establecimientos (2/16) tienen un sistema de dry lot, en donde los animales también son alimentados con pasturas naturales y suplemento, pero se encuentran en un área elevada con una pendiente que permite evacuar el agua en épocas de lluvia. El establecimiento restante tiene un sistema de free stall, con los animales confinados y un manejo más intensivo. A su vez, fue descrita la presencia de perros en la mayoría de los tambos encuestados (**Fig. 12**).

En la mayoría de los establecimientos se aplicaba vacuna reproductiva, aunque en ninguno de ellos se informó la existencia de un plan sistemático y organizado de vacunación. En la mayoría de los tambos se aplicaban vacunas cuando se percibía un aumento en las tasas de aborto.

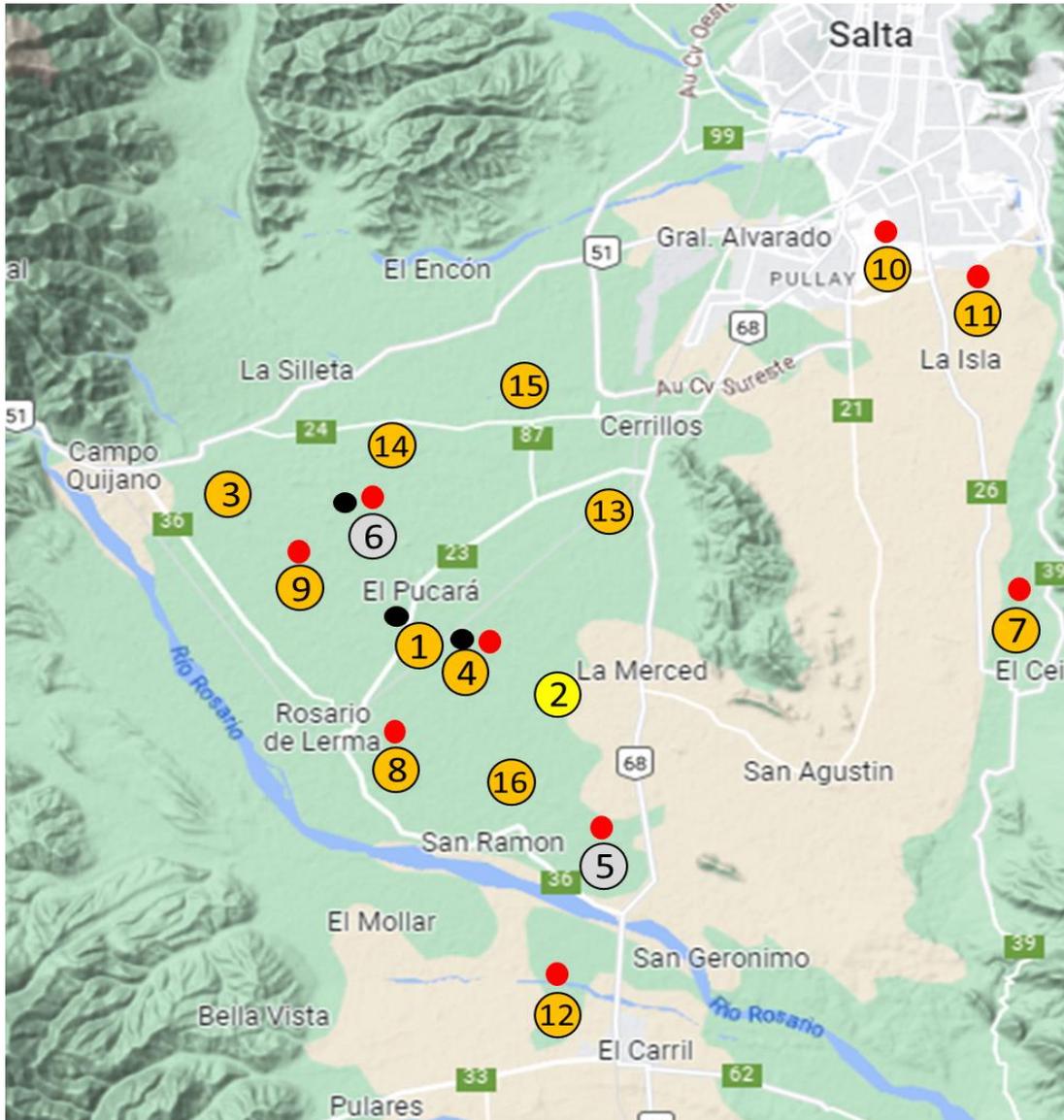


Fig. 12: Los círculos señalan la ubicación de los tambos muestreados (enumerados del 1 al 16). El color del fondo del círculo denota el sistema productivo del establecimiento. ● (Naranja) Pastoreo a campo con Suplementación (PcS); ● (Amarillo) free stall; ● (Gris) dry lot; ● (Rojo): tambos en donde fue posible muestrear cánidos; ● (Negro): tambos que comparten la misma acequia.

| Tambos | Tipo de manejo | N° de vacas en ordeño | Intervalo parto-parto (promedio) | Vacuna reproductiva | Porcentaje de abortos | Presencia de cánidos | Locación (MSNM) |
|--------|----------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 1 | PcS | 260 | 470 | Sí | 2 | No | 1337 |
| 2 | Free stall | 264 | 458 | No | 7 | No | 1248 |

| Tambos | Tipo de manejo | N° de vacas en ordeño | Intervalo parto-parto (promedio) | Vacuna reproductiva | Porcentaje de abortos | Presencia de cánidos | Locación (MSNM) |
|--------|----------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 3 | PcS | 213 | 432 | Sí | 2 | No | 1430 |
| 4 | PcS | 320 | 454 | Sí | 8 | Sí | 1188 |
| 5 | <i>Dry lot</i> | 210 | 429 | Sí | 7 | Sí | 1202 |
| 6 | <i>Dry lot</i> | 330 | 438 | Sí | 5 | Sí | 1353 |
| 7 | PcS | 250 | 445 | No | 5 | Sí | 1142 |
| 8 | PcS | 60 | 451 | Sí | 3 | Sí | 1304 |
| 9 | PcS | 250 | 456 | Sí | 7 | Sí | 1382 |
| 10 | PcS | 230 | 490 | Sí | 10 | Sí | 1163 |
| 11 | PcS | 196 | 496 | Sí | 10 | Sí | 1185 |
| 12 | PcS | 195 | 440 | Sí | 4 | Sí | 1246 |
| 13 | PcS | 135 | 447 | Sí | 18 | No | 1266 |
| 14 | PcS | 89 | 477 | Sí | 25 | Sí | 1338 |
| 15 | PcS | 110 | 500 | No | 14 | No | 1306 |
| 16 | PcS | 241 | 455 | Sí | 19 | No | 1285 |

Tabla 4. Características de los tambos encuestados, tipo de manejo o sistema productivo: PcS; Pastoreo a campo con Suplementación; *Dry lot* y *Free Stall*. Número de vacas en ordeño. Intervalo entre partos. Uso de vacuna reproductiva. Porcentaje de abortos. Presencia de cánidos (no fue posible tomar muestra en todos los tambos). Locación en relación a metros sobre el nivel del mar (MSNM)

Análisis serológico de muestras bovinas provenientes de diferentes tambos

Los datos de serología obtenidos para *N. caninum* en sueros bovinos y caninos se muestran en la **tabla 5**.

El análisis de presencia de anticuerpos anti *N.caninum* en el suero de los animales reveló que la totalidad (el 100%) de los tambos presentó al menos 2 bovinos con serología positiva para *N. caninum*, lo que evidenció la importante circulación de la enfermedad. En aquellos campos en los se obtuvieron muestras de perros, se verificó un porcentaje alto de seropositividad.

| Tambo | N° de muestras (bovinos) | Serología positiva en bovinos (%) | Infecciones crónicas en bovinos (%) | N° cánidos domésticos | Cánidos sero-positivos (%) |
|-------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 37 | 47 | 30 | ND | ND |
| 2 | 101 | 36 | 78 | ND | ND |
| 3 | 40 | 5 | 100 | 1 | ND |
| 4 | 39 | 41 | 56 | 4 | 50 |
| 5 | 38 | 23 | 88 | 4 | 50 |
| 6 | 40 | 40 | 62 | 6 | 83,33 |
| 7 | 39 | 35 | 43 | 10 | 80 |
| 8 | 39 | 25 | 70 | 3 | 66,67 |
| 9 | 40 | 32,5 | 0 | ND | ND |
| 10 | 40 | 52,5 | 42,9 | ND | ND |
| 11 | 40 | 45 | 38,9 | 3 | 100 |
| 12 | 40 | 47,5 | 31,6 | 6 | ND |
| 13 | 40 | 62,5 | 32 | ND | ND |
| 14 | 40 | 11,9 | 80 | ND | ND |
| 15 | 40 | 24,3 | 60 | 4 | ND |
| 16 | 40 | 35,8 | 64,3 | ND | ND |

Tabla 5. Seroprevalencia de *N. caninum* y porcentaje de animales con infecciones crónicas. Las infecciones crónicas corresponden a un IA > 65%. ND: no determinado.

En cuanto a las muestras de los bovinos, de un total de 693 muestras bovinas analizadas, 244 fueron positivas. Esto arroja una seroprevalencia aparente del 35,5% (IC = 0,32-0,39) y una seroprevalencia verdadera del 35,9% (IC = 0,32-0,40). La media estimada de la seroprevalencia intrarodeo fue del $35,3 \pm 14,9\%$ (límites: 5% al 62,5%). La distribución de la frecuencia de la seroprevalencia de *N. caninum* en los rodeos estudiados indica que el 43,7% de ellos tiene una prevalencia mayor del 40% (**Fig. 13**).

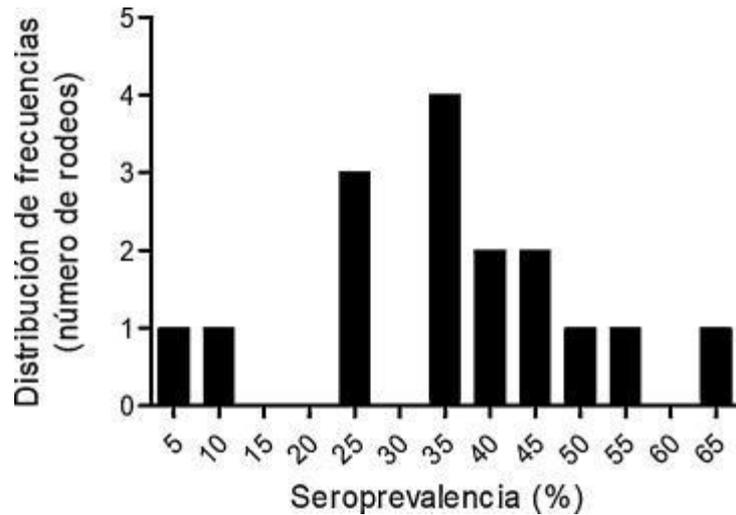


Fig. 13: Análisis de frecuencias de la seroprevalencia de *N. caninum* en los tambos. Donde se presentan por un lado la seroprevalencia a *N. caninum* (eje X) y el número de establecimientos que se encuentran con determinada seroprevalencia (eje Y).

En al menos la mitad de los establecimientos en los que se tomaron muestras de sangre de perros, las mismas presentaron anticuerpos específicos anti-*N. caninum*. El promedio de animales seropositivos fue de $71,7 \pm 19,9\%$. Si bien la presencia de perros infectados y la seroprevalencia intrarodeo no estuvieron asociadas de manera estadísticamente significativa, se detecta una tendencia que podría indicar una relación positiva entre ambas variables. Se necesitan más datos para confirmar esta asociación (Fig. 14).

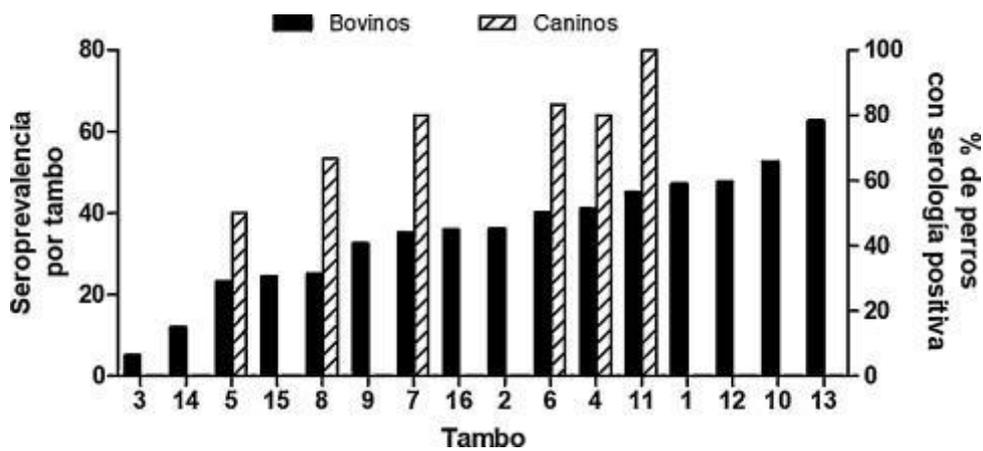


Fig. 14: Número de tambo (eje X). Asociación entre la seroprevalencia de *N. caninum* y el porcentaje de perros con serología positiva (eje Y).



Fig. 15: La mayoría de los tambos incluidos en este estudio, contaron con la presencia de perros.

Identificación de animales con Infecciones crónicas vs agudas

Mediante la aplicación del ELISA de avidéz, que mide la fuerza de pegado de los anticuerpos específicos al antígeno, se determinó que el 43,7% de los bovinos positivos presentaban infecciones crónicas (IA mayor del 65%) y, por lo tanto, más de la mitad de los animales estudiados cursaban una infección aguda (**Tabla 5**). También se encontró una asociación negativa ($r_2 = 0,33$; $p < 0,02$) entre la seroprevalencia y las infecciones crónicas determinadas según el IA de IgG. Se observa claramente que los establecimientos que poseen menor seroprevalencia son aquellos en los que la incidencia de infecciones crónicas es mayor que la de infecciones agudas. Además, se observó una asociación positiva entre infecciones agudas y sistema productivo de Pastoreo a campo con Suplementación (test de Fisher; $p = 0,0294$). (**Fig.16**).

No se encontró asociación entre la seroprevalencia y la tasa de abortos anuales (**Fig. 17A**). Sin embargo, se pudo observar una tendencia a una mayor tasa de abortos en aquellos tambos con mayores niveles de infecciones agudas con *N. caninum* (**Fig. 17B**), mientras que el porcentaje de infecciones crónicas no guarda relación con la tasa de abortos (**Fig. 17C**).

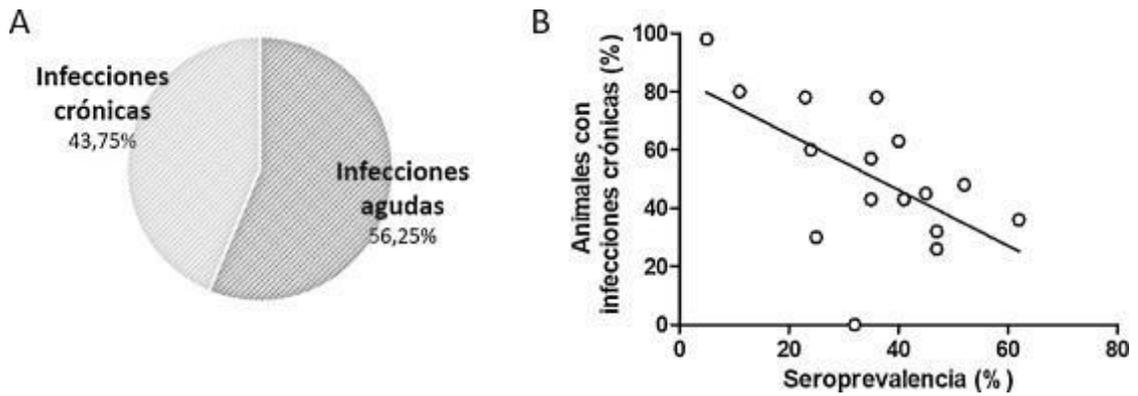


Fig. 16: Porcentaje de animales con infecciones crónicas y agudas, determinado según la avidéz de los anticuerpos totales específicos (IA mayor o menor del 65%, respectivamente) (A). Asociación entre el porcentaje de infecciones crónicas intratambo y la seroprevalencia de *N. caninum* en los rodeos (B).

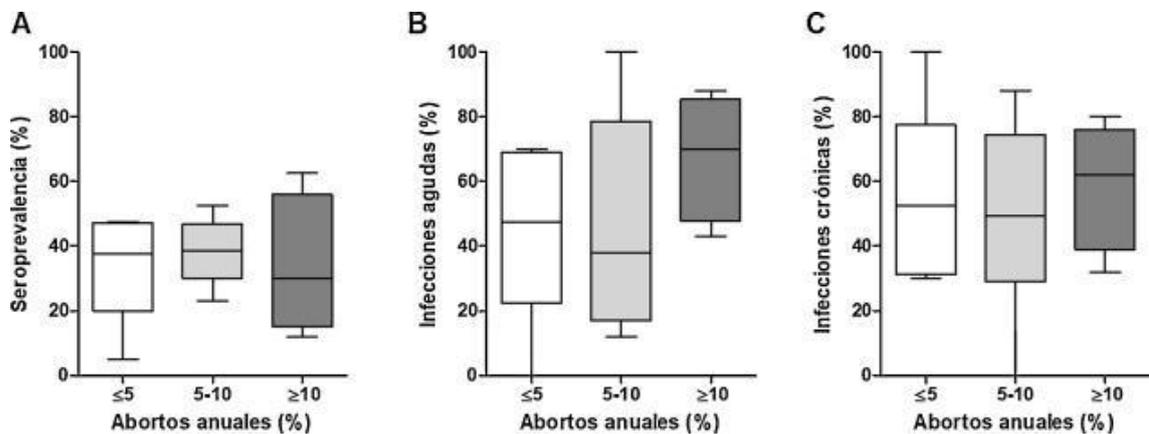


Fig. 17: Asociación entre abortos anuales y seroprevalencia de *N. caninum* Asociación entre abortos anuales y seroprevalencia de *N. caninum* (A), infecciones agudas (B) e crónicas (C).

Detección genoma *N. caninum*

En algunos de los tambos incluidos en este estudio, hubo presencia de abortos bovinos (fetos y sus envolturas). Fue posible tomar muestras de sistema nervioso central de los terneros abortados (SNC) y de placenta (cotiledones). Debido a que los tambos cuentan con la presencia de perros y visitas nocturnas frecuentes de zorros, no fue posible tomar muestras de todos los abortos producidos en los establecimientos. A partir de las muestras obtenidas y por medio del análisis por PCR-NESTED fue posible identificar un resultado positivo en una muestra de SNC de un feto abortado (**Fig. 18**).

Este resultado positivo, fue coincidente con la serología positiva a *N. caninum* de la vaca que abortó este ternero.

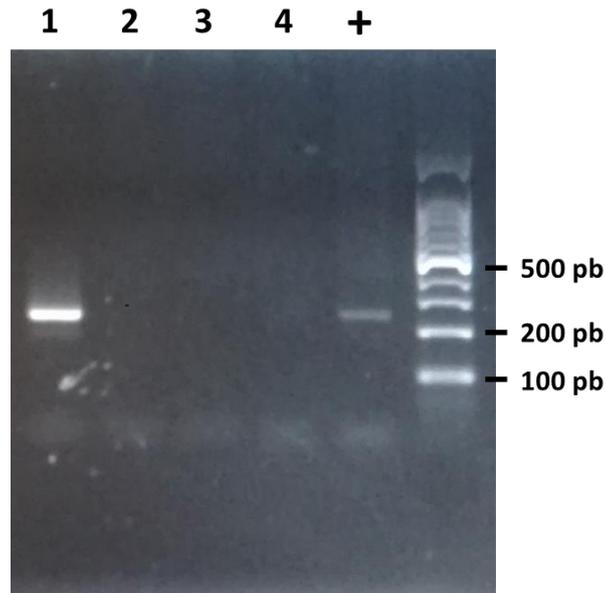


Fig. 18: Detección de genoma de *N. caninum* por método PCR-NESTED en muestras individuales provenientes de productos de abortos bovinos: 1) Muestra positiva de SNC. 2) Muestra negativa de cotiledones. 3) Muestra negativa de SNC. 4) Control negativo. 5) Control positivo. El producto final de la reacción se reveló en un gel de agarosa al 1,8%. Se amplificó la región ITS I (Internal transcribed I) del parásito *N. caninum*. En el primer ciclado se obtuvo un fragmento de 500bp (no mostrado), mientras que en el segundo ciclado (NESTED para aumentar sensibilidad), el tamaño del fragmento fue de 279bp.

Discusión

En este estudio hemos caracterizado por primera vez la seroprevalencia de *N. caninum* en la cuenca lechera del Valle de Lerma, situado en la provincia de Salta, y hemos analizado diferentes factores de riesgo para su transmisión de esta parasitosis en esta región, incluyendo aspectos geográficos, de manejo productivo y ecológicos. Detectamos animales seropositivos en la totalidad de los tambos muestreados, con una seroprevalencia alta a nivel rodeo (valor promedio del 35,3% y un valor máximo del 62,5%), sin diferencias entre las prevalencias aparentes y las reales debido a la alta sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA utilizada. Estos valores remarcan la importancia que tiene *N. caninum* en la sanidad de estos establecimientos.

En la región central de Argentina, estudios previos hallaron también una elevada circulación de *N. caninum*, con casi la totalidad de los rodeos lecheros muestreados positivos, aunque con prevalencias menores [135, 260].

Resulta importante destacar que el 43,7% de los tambos presentaron seroprevalencias superiores al 40%, con anticuerpos predominantemente de baja avidéz, lo que denota la gran dispersión de la enfermedad con carácter epidémico en esta región. Esto remarca la importancia de establecer programas de manejo y control, considerando el escaso número

de animales seronegativos presentes para reemplazos y los costos de las vaquillonas a incorporar.

No encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre la seroprevalencia de *N. caninum* en los rodeos y los datos productivos de estos, probablemente debido a que el manejo productivo y reproductivo es similar en la mayoría de los tambos.

Varios trabajos han propuesto al manejo intensivo como un factor de riesgo clave para explicar la mayor prevalencia de *N. caninum* que se suele observar en los tambos comparados con los rodeos de cría, lo cual se adjudicó a una mayor exposición posnatal a ooquistes que contaminan el agua y el alimento del ganado [101, 289, 328]. Otros estudios, por el contrario, han identificado la transmisión vertical endógena como factor de riesgo en tambos con sistemas intensivos [32, 45, 139]. En la cuenca del río Salado (principal área de cría de ganado de Argentina), los sistemas extensivos no estarían asociados a la transmisión horizontal del parásito [83], aunque se reportó un tambo en la provincia de Buenos Aires con seroprevalencia muy alta (80,9%) y en donde la frecuencia estimada de transmisión horizontal superaba a la de transmisión vertical (el 51 y el 37,1%, respectivamente) [261].

En este sentido, nuestros resultados muestran que el tambo con sistema intensivo (free stall) posee una mayor cantidad de infecciones crónicas, lo que sugiere la menor circulación de ooquistes. Lo mismo observamos en los campos con sistema de dry lot, en donde el escurrimiento del agua de lluvia y riego, favorecido por la pendiente de estas zonas, podría limitar el contacto de los quistes con el alimento. Estos datos sugieren que tanto el sistema de manejo (intensivo o extensivo) como las condiciones topográficas (altura, pendiente) y otras particularidades (acequias de agua de lluvia compartidas entre distintos tambos) deberían ser consideradas en futuros estudios que abarquen mayor número de tambos de similares características, ubicados en esta misma región o en otras.

Las características climáticas también podrían comportarse como un factor de riesgo asociado al aborto, aunque hay pocos datos al respecto. Se ha observado que un incremento en el nivel de precipitaciones en ambientes secos puede comprometer el éxito de la preñez en vacas infectadas con *N. caninum* [227].

La transmisión horizontal no ha sido tradicionalmente considerada como la más importante debido a su menor asociación con abortos en comparación con la transmisión vertical [100, 146, 163, 244], aunque se ha establecido que también puede contribuir al mantenimiento de una alta seroprevalencia en rebaños infectados endémicamente [32, 289].

En los tambos en los que se pudieron tomar muestras de perros, se encontró al menos un animal seropositivo, lo que evidencia una posible fuente de contagio importante. Todos los tambos reportaron la presencia de zorros y comadreas; en muchos casos, se observó

incluso la presencia de madrigueras y perros en los depósitos donde se almacena el alimento. Esto sugiere que la presencia de los perros en los rodeos bovinos constituye un factor de riesgo para este tipo de transmisión, tal como se ha informado previamente [32, 199, 266].

Nuestros resultados remarcan la importancia que tiene identificar los distintos factores de riesgo y diferenciar infecciones horizontales de verticales, y, a su vez, determinar si estas son endógenas o exógenas, para caracterizar la situación epidemiológica de una región en particular. Estos datos, sin duda, serán esenciales para la confección de un plan de manejo tendiente al control de esta enfermedad.

Conclusión

- Este trabajo demuestra por primera vez la existencia de bovinos seropositivos a *N. caninum* en la cuenca lechera del Valle de Lerma, en la provincia de Salta. En los tambos estudiados de esta región, se evidencia una alta prevalencia endémica de neosporosis, con un 100% de rodeos positivos y una prevalencia promedio intrarodeo del 35%, especificándose que estos datos corresponden exclusivamente a los tambos objeto de análisis, no a la totalidad de los tambos en el Valle de Lerma
- Se encontró una asociación positiva entre la seroprevalencia y la presencia de infecciones agudas en animales adultos, lo que sugiere que el principal mecanismo de dispersión de la enfermedad en esta región es la transmisión horizontal.
- La presencia de perros infectados, la ubicación geográfica y el libre pastoreo serían los principales factores de riesgo con efecto sobre este tipo de transmisión.

CAPITULO 2

PERFIL DE RESPUESTA INMUNE DE VACAS PRE-PARTO Y TERNEROS PRIVADOS DE CALOSTRO: EVIDENCIA DE REDUCIDA TRANSMISION VERTICAL DE *N. CANINUM* ASOCIADOS A ELEVADOS NIVELES SERICOS DE IgG1 QUE IgG2 Y PRESENCIA DE INF- γ EN VACAS INFECTADAS QUE NO ABORTARON

Objetivos

- Establecer la dinámica de contagios de neosorosis en la situación particular de la CVLSa.
- Analizar en condiciones a campo el perfil de respuesta inmune en vacas preñadas con infección crónica y que no abortaron, para discernir la relación entre perfil de respuesta inmune y el aumento de riesgo de infección congénita.

Materiales y métodos específicos

Toma de muestra

Durante el último tercio de la preñez fueron muestreadas un total de n=75 vacas raza Holando pertenecientes a 3 tambos, clasificados en: tambo A (n=16), B (n=39) y C (n=20).

Estos tambos presentaban una seroprevalencia promedio a *N. caninum* del 35% y el mayor porcentaje de vacas cursaban infección crónica. Con una tasa de aborto anual del 7%. Las vacas estaban vacunadas al menos con 3 dosis contra el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV) con la última dosis 6 meses previos al parto.



Fig. 19: Toma de muestra de sangre por venopunción yugular a terneros post parto, privado de calostro. Una vez que se les tomó la muestra de sangre, se les permitió la ingesta de calostro maternal.

Los terneros fueron separados de la madre (privados de calostro) y muestreados al nacer (**Fig. 19**), luego recibieron el calostrado correspondiente. Tanto las madres como

sus terneros fueron monitorizados durante 5 días por un veterinario responsable de cada tambo. Las madres y los terneros fueron muestrados para evaluar la presencia de anticuerpos totales anti *N. caninum*. Aquellas muestras que fueron positivas a *N. caninum* se analizaron para determinar la avidéz de anticuerpos específicos.

Los análisis realizados para confirmar la no ingestión de calostro por parte de los terneros previamente a la toma de muestra se basaron en medir γ -glutamil transferasa (GGT Activity Colorimetric Assay Kit, Sigma) y un ELISA de fase líquida descritos anteriormente [237] que mide anticuerpos vacunales contra la cepa A-24 Cruzeiro del virus de la Fiebre Aftosa (FMDV). Las vacas fueron testeadas contra enfermedades virales endémicas que se conocen modulan el perfil de respuesta inmune frente a otros antígenos. Se realizó la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina (BLV), con el uso de un ELISA in-house, "LEUKOFAST" [366]. Para la detección de anticuerpos contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) se utilizó un Kit comercial de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Prio-check VDVB Ab, Termofisher). Del mismo suero, para la detección de ARN viral se realizó RT nested-PCR, siguiendo los procedimientos standard [232].

La presencia de IgG anti *N. caninum* en suero se analizó utilizando un ELISA in-house validado contra un Kit comercial. El índice de avidéz (AI) se calculó como el porcentaje de actividad residual de la muestra de suero después del lavado con urea, en relación con la muestra no tratada: $AI\% = (OD \text{ simple con urea} / OD \text{ muestra sin urea}) \times 100$.

Se utilizó la misma plataforma de ELISA descrita anteriormente para titular los diferentes isotipos de IgG e IgM, como se detalla en la sección (ELISA Isotipos anti *N. caninum* en Materiales y Métodos generales).

Los niveles de IFN- γ se cuantificaron en muestras de plasma estimulado individuales utilizando un kit comercial de ELISA.

Análisis estadístico

Fue utilizada la prueba de Man Whitney para obtener dos grupos diferenciados: las madres que transmitieron la infección a sus crías, como transmisión vertical (VT) y madres que no lo hicieron, como sin (no) transmisión vertical (NT) (**Fig. 20**).

Se utilizó el odds ratio y se estimó la significancia aplicando el test exacto de Fisher para analizar si el grupo de madres que transmitían el parásito a sus crías estaban o no relacionadas con algún parámetro inmunológico, género, número de embarazos o infecciones por BLV o VDVB. El intervalo de confianza utilizado fue del 95%.

Resultados

Se tomaron muestras de suero para detectar anticuerpos contra *N. caninum* un total de n=75 vacas raza Holando que cursaban el último tercio de preñez. Los animales paertenecían a 3 tambos, denominadas tambo A (n=16), B (n=39) y C (n=20). Las muestras también se analizaron para VDVB y BLV, ambas infecciones virales conocidas por modular el perfil de la respuesta inmune [87, 304].

La seroprevalencia de BLV en términos de anticuerpos anti-BLV (virus completo) fue alta en todos los tambos, con un rango del 80 al 90%. La seropositividad para los anticuerpos anti NS3 del VDVB fue de alrededor del 50%. Los tres tambos tenían antecedentes de vacunación contra VDVB con vacunas comerciales a virus inactivado.

Todas las madres incluidas en este estudio presentaron anticuerpos específicos de alta avidéz (por encima del 60%) y niveles bajos de IgM (**Fig. 21C**), ambos son indicadores de enfermedad crónica [51], lo que significa que habían sido infectadas antes de la preñez (**Tabla 6**).

| <i>N. caninum</i> Madres seropositivas | | | | | | | Terberos | | |
|--|-----------|-------|------------|--------------------|---------------|---------------------------|----------|--------------------------|---------------------------|
| ID | Categoría | Tambo | BLV-p24 Ac | VDVB (Ac anti-NS3) | VDVB (RT-PCR) | <i>N. caninum</i> Ac – AI | Género | Status <i>N. caninum</i> | <i>N. caninum</i> Ac - AI |
| A72 | Novilla | A | + | + | - | 39 | Macho | + | 46 |
| A73 | Vaca | A | + | - | - | 83 | Macho | + | 85 |
| A74 | Novilla | A | + | + | - | 90 | Hembra | + | 52 |
| B61 | Novilla | B | + | - | + | 63 | Macho | + | 52 |
| B62 | Novilla | B | + | - | + | 80 | Hembra | + | 72 |
| B63 | Novilla | B | + | - | - | 73 | Macho | + | 70 |
| B64 | Vaca | B | + | + | - | 89 | Hembra | + | 59 |
| B65 | Novilla | B | + | - | + | 87 | Macho | + | 27 |
| B67 | Vaca | B | + | - | - | 94 | Macho | + | 77 |
| B66 | Novilla | B | + | - | + | 91 | Hembra | + | 52 |
| B68 | Novilla | B | + | + | - | 79 | Macho | + | 92 |
| B69 | Vaca | B | + | - | + | 72 | Hembra | + | 76 |
| B70 | Novilla | B | + | + | - | 57 | Macho | + | 100 |
| B71 | Novilla | B | + | - | - | 74 | Hembra | + | 72 |
| C75 | Novilla | C | + | + | - | 70 | Hembra | + | 49 |
| A37 | Vaca | A | + | + | - | 46 | Macho | - | - |
| A43 | Vaca | A | + | + | - | 90 | Macho | - | - |
| B24 | Novilla | B | - | + | - | 93 | Hembra | - | - |
| C45 | Vaca | C | + | + | - | 82 | Hembra | - | - |
| C55 | Novilla | C | - | + | - | 44 | Hembra | - | - |
| C56 | Vaca | C | + | + | - | 81 | Hembra | - | - |

Tabla 6: Indicadores de enfermedad crónica. A las madres seropositivas a *N. caninum*, de diferentes categorías y tambos, se les realizaron pruebas de anticuerpos (Ac) contra el virus de la leucosis bovina (antígeno de virus completo "BLV") y el virus de la Diarrea Viral Bovina ("VDVB", antígeno NS3). El genoma de VDVB se detectó mediante PCR anidada en RT en muestras de suero. Todos los animales tenían alta avidéz de anticuerpos anti-*N. caninum* (expresado como índice de avidéz en porcentaje, "IA"). También se muestran el género, el estatus a *N. caninum* y el IA de los terberos recién nacidos.

Los terneros recién nacidos fueron sangrados inmediatamente después del nacimiento y la ausencia de ingesta de calostro se confirmó midiendo los niveles séricos de γ -glutamil transferasa y anticuerpos anti-FMDV [237].

Los anticuerpos (Ac) contra el virus de la fiebre aftosa sirvieron como un excelente marcador de transferencia pasiva de Ac, ya que las madres habían sido vacunadas contra el virus de la fiebre aftosa por lo menos cuatro veces con una vacuna tetravalente comercial y la última vacunación se realizó durante el período de preñez, condición que asegura altos niveles de anticuerpos transferidos pasivamente [70]. Estas sencillas herramientas serológicas nos permitieron clasificar las parejas madre-cría según su estado de transmisión (VT y NT) (**Fig. 20**). Aunque no podemos descartar el evento de reinfección horizontal, lo más probable es que las madres examinadas hayan experimentado una infección endógena debido a la ausencia de parásitos circulantes en el rebaño, apoyado por la falta de animales infectados con la forma aguda en las madres seronegativas que no seroconvirtieron al final del experimento y sirvieron como centinelas para cada tambo (datos no mostrados).

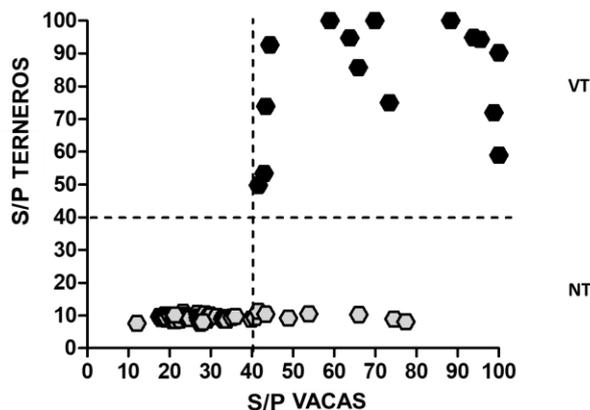


Fig. 20: Los animales se agruparon en 2 grupos: vacas que transmitieron la infección a sus crías (transmisión vertical) corresponden los puntos de color negro (VT) y vacas en las que no se verificó transmisión vertical se indican con los puntos de color gris, como "no transmisión" (NT).

Esta situación la atribuimos transmisión vertical (madre - ternero), luego de confirmar, con las pruebas antes descritas, que los terneros no ingirieron calostro, pero presentaban anticuerpos anti *N. caninum* en suero. Se seleccionaron 22 parejas vaca/ternero, teniendo en cuenta las madres seropositivas a *N. caninum* con la muestra de suero de sus terneros privados de calostro (toma de muestra de sangre previa ingestión de calostro). Estas parejas se agruparon según el estado de transmisión vertical. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la tasa de transmisión y el número de preñeces (primerizas: novillas, múltiples gestaciones: vacas), la infección por VDVB o sexo de los terneros ($p > 0.05$, test exacto de Fisher).

Debido a la alta prevalencia de animales seropositivos para BLV, no fue posible calcular las diferencias entre los grupos. Algunos animales dieron positivo a VDVB debido a un cuadro de infección aguda en el tambo B, todos ellos dieron negativo para el genoma de VDVB y positivos para anticuerpos NS3 posteriores al parto (**Tabla 7**).

La mayoría de las madres infectadas con VDVB formaban parte del grupo VT. En el grupo NT, ninguno de los animales estaba infectado con VDVB en el momento del estudio (solo una novilla, B 24, pertenecía al tambo B dentro del grupo NT). Es sabido que VDVB induce una supresión inmunológica que puede estar relacionada con una disminución de la respuesta inmune [87] que a su vez puede aumentar el riesgo de transmisión. No podemos derivar un resultado concluyente a esta situación, respecto de nuestros datos, debido al número limitado de animales infectados con VDVB. Se necesitaría un estudio adecuado para verificar si estas dos enfermedades están relacionadas.

Se analizaron los niveles totales de IgG, los títulos de subtipos de IgG (IgG1 e IgG2), la avidéz de la IgG específica y los niveles sistémicos de IFN- γ en vacas preñadas con infección crónica a fin de estudiar la posible asociación entre un perfil inmunitario particular y la transmisión congénita de *N. caninum*. La transmisión vertical no se relacionó con la cantidad de anticuerpos totales anti- *N. caninum*, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos VT y NT (**Fig. 21A**). En estos dos grupos los niveles de avidéz fueron altos y similares (**Fig. 21B**). Los niveles de IgM (**Fig. 21C**) fueron similares entre ambos grupos y los valores de DO fueron bajos en comparación con los asociados con una respuesta inmune primaria [237].

Los títulos de IgG1 específicos también fueron similares entre ambos grupos (**Fig. 21D**), mientras que los títulos de IgG2 fueron más bajos para el grupo NT (**Fig. 21E**), aunque no fueron estadísticamente significativos probablemente debido al número limitado de animales. Sin embargo, y aun considerando el pequeño número de animales incluidos en el ensayo, hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos grupos en la relación IgG1/IgG2 (**Fig. 21F**), es decir, las madres que transmitieron el parásito a sus crías tuvieron mayores títulos séricos de IgG2 que de IgG1.

Con el objeto analizar si una proporción baja de IgG1/IgG2 estaba relacionada con una mayor probabilidad de transmitir *N. caninum* a las crías, examinamos la importancia de la asociación (contingencia) entre las dos condiciones utilizando la prueba exacta de Fisher. Los resultados mostraron que el 80% de las madres que transmitieron el parásito tenían valores de IgG1/IgG2 por debajo de 1, es decir mayor cantidad de IgG2 que IgG1; mientras que el 90% de las que no transmitieron, tenían una relación por arriba de 1 (**Fig. 22A**). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Además, se midió valores de IFN- γ sistémico por ELISA y se confirmó que la presencia de IFN- γ y una

relación IgG1/IgG2 superior a 1 estaba asociada a una tasa de transmisión más baja (**Fig. 22B**).

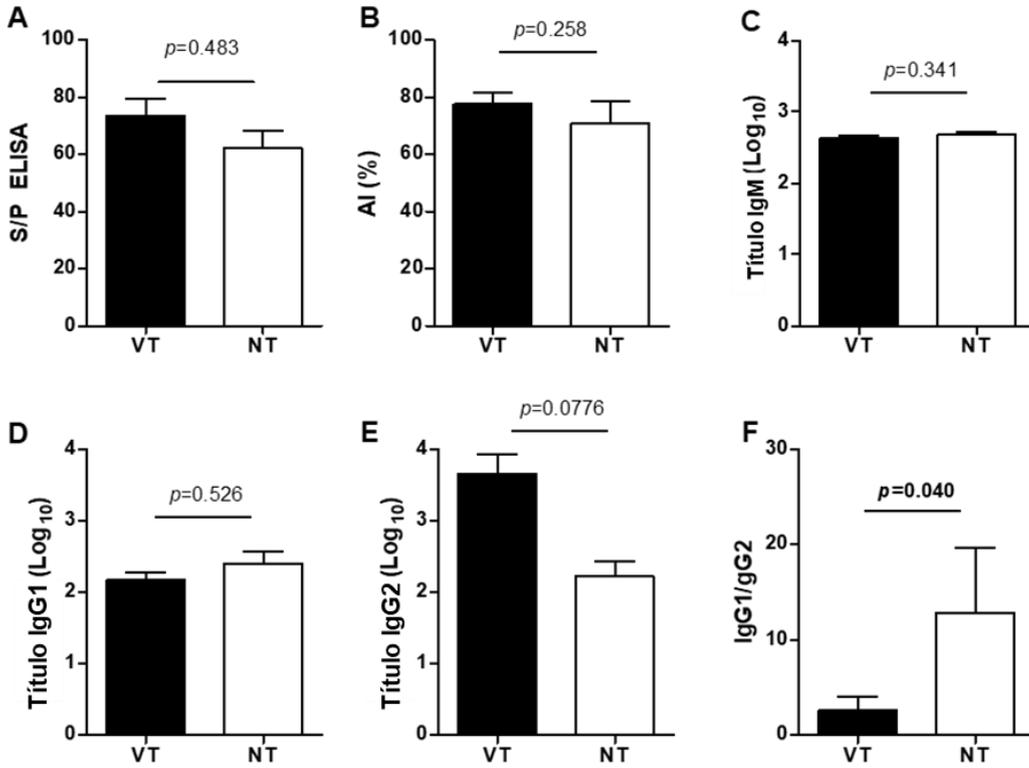


Fig. 21: Títulos IgG específicos a *N. caninum*, de avidéz, IgGM, IgG1, IgG2 y la relación entre IgG1/IgG2. Ensayos serológicos realizados en muestras de suero de madres. Las mismas se agruparon según su estado de transmisión vertical (VT) o sin (no) transmisión vertical (NT), como se explicó anteriormente. Las muestras de suero de cada grupo se analizaron individualmente mediante diferentes ELISAs. (A) Presencia de IgG anti *N. caninum*. Los datos se analizaron usando las pruebas de Man Whitney. Los valores de p se muestran en cada gráfico.

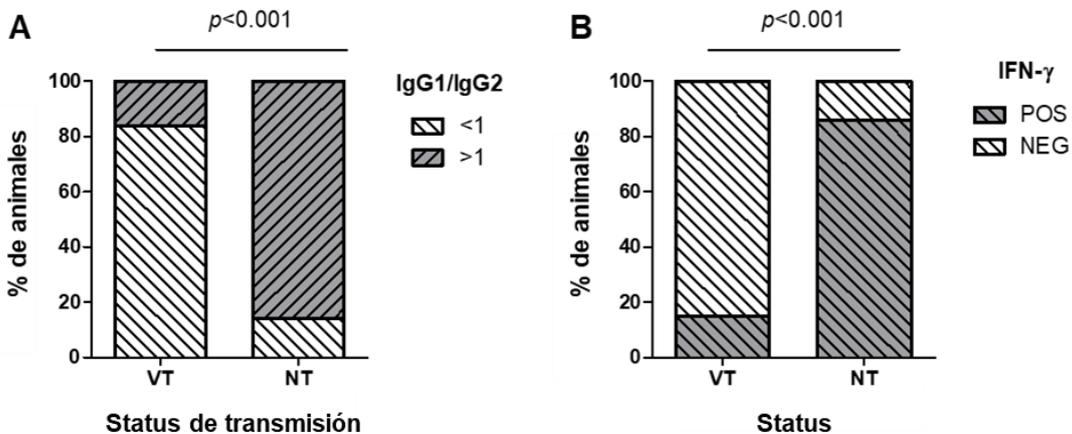


Fig. 22: Presencia de IFN- γ y una relación IgG1/IgG2. Asociación entre perfil inmunológico y tasa de transmisión. Se aplicó el test exacto de Fisher para analizar si la proporción de animales

que transmiten o no el parásito a su descendencia estuvieron relacionada con (A) la relación de títulos séricos de IgG1 a IgG2 o con (B) los niveles de IFN- γ sistémico. Los valores estaban por debajo de $p < 0,01$, como se indica en cada gráfico.

Discusión

Este estudio incluyó vacas infectadas y terneros nacidos a término con infección congénita, y se encontró una asociación entre títulos séricos más altos de anticuerpos anti-*N. caninum* IgG1 que IgG2 y presencia de IFN- γ con protección contra la infección congénita, mientras que el perfil opuesto (mayor IgG2 que IgG1 en ausencia de IFN- γ) se relacionó con transmisión de tipo vertical.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con investigaciones previas que describen títulos elevados de IgG2 en vacas que parieron terneros infectados congénitamente en condiciones naturales a campo [161]. En el mismo sentido otros autores [10] analizaron si los niveles sistémicos de IgG1, IgG2 y/o IFN- γ estaban asociados con el aborto en novillas crónicamente infectadas, y concluyeron que las hembras que abortaron tenían títulos más altos de IgG2 que de IgG1 y bajos niveles de IFN- γ sistémico. En ese estudio, los autores discutieron las variaciones en los subtipos de anticuerpos y su relación con la presencia o ausencia de IFN- γ , que aún no está del todo claro en bovinos. Otros estudios describieron que la infección transplacentaria estaba asociada a un aumento de títulos de anticuerpos IgG2 anti *N. caninum* [161].

La IgG1 bovina comparte algunas características funcionales con la IgG2, como la unión a los neutrófilos y la mediación de la opsonofagocitosis, pero también tiene atributos únicos: es la principal subclase de Ig en el calostro y puede liberarse como inmunoglobulina secretora en la mucosa [329], siendo de esta manera particularmente importante para la protección. Tanto IgG1 como IgG2 se consideran importantes contribuyentes en la protección contra patógenos intracelulares y extracelulares [382]. La relación IgG1/IgG2 ha surgido como correlato de protección para varias enfermedades bovinas, más que el título absoluto [60, 169, 211]. Para el virus de la fiebre aftosa, la protección se ha relacionado con títulos más altos de IgG1 que de IgG2 [83, 211] y asociada con la presencia de IFN- γ [69]. En estudios previos se mostró que una formulación de vacuna experimental que contenía un extracto soluble de taquizoítos y un adyuvante a base de soja con agonistas de TLR produjo elevados niveles de anticuerpos específicos de alta avidéz e IFN- γ en el ganado vacunado [236]. El perfil inmunitario provocado por esta vacuna fue similar al descrito para controlar la infección aguda por *N. caninum* [233, 324, 386]. Además, la producción de IFN- γ durante la preñez evitó el aborto en bovinos naturalmente infectados [10, 226].

Es importante tener en cuenta que estos parámetros inmunológicos se pueden evaluar fácilmente el riesgo de aborto, sencillamente ejecutando ELISAs con muestras de campo; esto es primordial cuando se trabaja en ensayos de vacunas a campo. Cuando se desarrollen vacunas los esfuerzos deberían centrarse en obtener este perfil inmunológico particular para reducir el riesgo de transmisión congénita en madres con infección crónica.

Conclusión

- Estos resultados sugieren que un perfil inmunológico que combina IgG1/IgG2 anti-*N. caninum* con altos niveles sistémicos de IFN- γ está asociado con un menor riesgo de infección transplacentaria en novillas y vacas con infección crónica.

CAPITULO 3

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN LA CUENCA LECHERA DEL VALLE DE LERMA DE LA PROVINCIA DE SALTA

Objetivo

Estudiar la epidemiología de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en la cuenca lechera del Valle de Lerma en la provincia de Salta utilizando equipos de diagnóstico desarrollados en el laboratorio de Inmunología Veterinaria Aplicada a partir de la toma muestras serológicas de diferentes categorías bovinas según diseño previo.

Materiales y métodos específicos

Toma de muestra y Encuesta epidemiológica

La toma de muestra y encuesta epidemiológica para este estudio fue la misma empleada para el estudio de la epidemiología de neosporosis. En este caso, el número de bovinos analizados para VDVB comprendió n= 640 hembras raza Holando.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de distribución de frecuencias relativas, la asociación entre variables no paramétricas se estimó mediante el Odds ratio y se asignó significancia estadística mediante test exacto de Fisher. El intervalo de confianza utilizado fue del 95%.

Resultados

Sistemas productivos y seroprevalencia

Las características de los sistemas productivos abordados en este estudio son aquellas que fueron previamente descritas en el capítulo 1. Se realizaron encuestas en 16 tambos ubicados en diferentes puntos del Valle de Lerma (**Fig. 12**).

Los resultados de la encuesta realizada en los tambos de la CLV Sa (**Tabla 4**) fueron también descritos en el capítulo 1. Brevemente la mayoría de los establecimientos (13/16) cuentan con un manejo que complementa al pastoreo, con Suplementación (PcS). Dos establecimientos (2/16) tienen un sistema de dry lot, en donde los animales también son alimentados con pasturas naturales y suplemento. El establecimiento restante tiene un sistema de free stall con un manejo más intensivo. Por otra parte, en la mayoría de los establecimientos se aplicaba vacuna reproductiva, aunque en ninguno de ellos se informó

la existencia de un plan sistemático y organizado de vacunación. En la mayoría de los tambos se aplicaban vacunas cuando se percibía un aumento en las tasas de aborto.

Análisis serológico de muestras bovinas provenientes de diferentes tambos

Se obtuvieron muestras de 640 bovinos (40 muestras por tambo). Se utilizó un ELISA comercial indirecto (PrioCHECK™ Bovine VDVB Ab, Thermo-Fisher Scientific) que identifica anticuerpos contra la proteína no-estructural NS3 (p80). Este análisis mostró que 348 muestras (54,3% del total) contenían anticuerpos contra el VDVB.

Para confirmar la reactividad de los anticuerpos contra proteínas virales, suspensiones virales fueron corridas en SDS-PAGE y luego enfrentadas a las muestras de suero individuales. Se incluyeron además un control positivo (punto amarillo, suero de un animal infectado, 45 dpi) y un control negativo (punto verde, animal naive, Page-Western Blot, **Fig. 23**). En este ensayo se identifican anticuerpos contra las proteínas virales estructurales y no estructurales del virus de la Diarrea Viral Bovina. Al no haber confirmado las identidades de las proteínas mediante anticuerpos específicos, recurrimos a la comparación de tamaños y a datos bibliográficos para identificar las proteínas correspondientes. Según esta aproximación, detectamos la mayor reactividad de los sueros positivos con proteínas de 80 y 53 Kd, que se corresponden con las proteínas NS3 y E2, respectivamente (**Fig. 23**).



Fig. 23: Análisis de muestras individuales de sueros bovinos por western blot. Se muestra un ensayo representativo.

Los datos obtenidos mediante ELISA comercial fueron coincidentes con los que arrojó el análisis por PAGE-WB (**Tabla 7**).

| TAMBO | NUMERO DE MUESTRAS | ELISA anti NS3 SEROLOGIA POSITIVA (%) | WB anti NS3 SEROLOGIA POSITIVA (%) | RT nested PCR N° ANIMALES PI |
|-------|--------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 1 | 40 | 90 | 90 | 1 |
| 2 | 40 | 100 | 100 | 0 |
| 3 | 40 | 90 | 90 | 0 |
| 4 | 40 | 90 | 90 | 2 |
| 5 | 40 | 80 | 80 | 1 |
| 6 | 40 | 50 | 50 | 1 |
| 7 | 40 | 40 | 40 | 1 |
| 8 | 40 | 70 | 70 | 1 |
| 9 | 40 | 80 | 80 | 1 |
| 10 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 40 | 80 | 80 | 1 |
| 12 | 40 | 10 | 10 | 1 |
| 13 | 40 | 0 | 0 | 1 |
| 14 | 40 | 0 | 0 | 1 |
| 15 | 40 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | 40 | 90 | 90 | 1 |

Tabla 7: Seroprevalencia de VDVB (por ELISA y WB) y número de animales PI. WB= Western Blot. Se analizaron 40 muestras por tambo, y se registran porcentajes de sero-positividad en las pruebas de ELISA y WB, así como el número de animales con presencia de genoma viral a partir de la RT nested PCR realizada con intervalo de 21 días para confirmar que se trata de bovinos persistentemente infectados.

La distribución de la frecuencia de la seroprevalencia de VDVB entre los rodeos estudiados indica que el 50% de los tambos presentaron valores mayores al 70% (**Fig. 24**). La mayoría de los tambos presentaron seroprevalencias superiores al 80% (8/16).

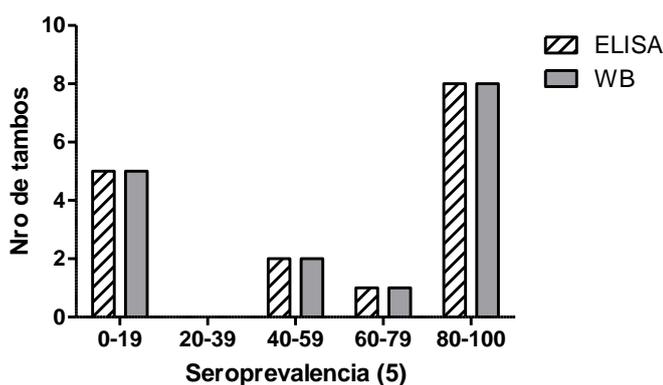


Fig. 24: Frecuencia de la seroprevalencia de VDVB en los tambos de la CVLSa basados en el uso del ELISA comercial que detecta anticuerpos contra la proteína no-estructural NS3 y el Western Blot (WB).

Identificación de bovinos persistentemente infectados

Para la identificación de bovinos PI se realizó RT nested-PCR sobre las muestras de suero. Los bovinos que arrojaron un resultado positivo fueron muestreados nuevamente 21 días después del primer muestreo y dichas muestras fueron sometidas los mismos análisis

Las muestras bovinas analizadas por RT nested-PCR mostraron una prevalencia de animales PI intra-rodeo del 2,18%. La mayoría de los establecimientos tenían al menos 1 animal con infección persistente mientras que solamente 3 de los establecimientos no contenían animales PI (**Fig. 25**).

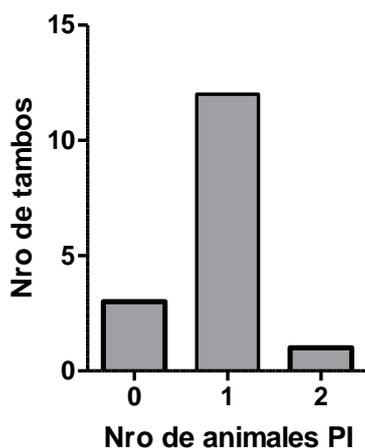


Fig. 25: Frecuencia de bovinos persistentemente infectados (PI) en los tambos de la CVLsa, donde es notable la existencia de al menos 1 bovino PI en la mayoría de los tambos.

| TAMBO | Tipo de manejo | Nº Animales PI |
|-------|----------------|----------------|
| 1 | Free Stall | 0 |
| 2 | PcS | 0 |
| 3 | PcS | 0 |
| 4 | PcS | 1 |
| 5 | Dry Lot | 1 |
| 6 | Dry Lot | 1 |
| 7 | PcS | 1 |
| 8 | PcS | 1 |
| 9 | PcS | 1 |
| 10 | PcS | 1 |
| 11 | PcS | 1 |
| 12 | PcS | 1 |
| 13 | PcS | 1 |
| 14 | PcS | 1 |
| 15 | PcS | 1 |
| 16 | PcS | 2 |

Tabla 8: Número de animales PI en tambos con diferente tipo de sistema productivo

No se hallaron asociaciones ni diferencias significativas entre la seroprevalencia con respecto al tipo de sistema productivo o el intervalo entre partos. No se hallaron asociaciones ni diferencias significativas entre la seroprevalencia con la producción de leche diaria o el porcentaje de abortos, datos que fueron recopilados en las encuestas.

Al analizar la presencia de animales PI con relación al tipo de sistema productivo se observó que en el sistema Free Stall y dos tambos con sistema de pastoreo con Suplementación no presentaron presencia de animales PI (**Tabla 8**).

Análisis de secuencias obtenidas de muestras positivas a VDVB

Del total de muestras bovinas analizadas, 14 de ellas contaban con genoma viral (animales PI). Los fragmentos de ADN del PCR fueron secuenciados para determinar la cepa del biotipo circulante en la región.

Se seleccionaron cuatro secuencias para llevar a cabo el análisis filogenético comparadas con aislamientos en otros países del continente europeo y de América del norte, Sudamérica y Argentina [30, 151, 176, 209, 294]. Estas muestras se encuentran detalladas en el árbol filogenético que se muestra en la **fig. 26** y están etiquetadas según el número del tambo del cual provienen: Tambo 1, Tambo 3, Tambo 4 y Tambo 11. En el análisis, se pudo establecer que los aislamientos obtenidos de los cuatro tambos exhiben similitud genética con la cepa VDVB-1b.

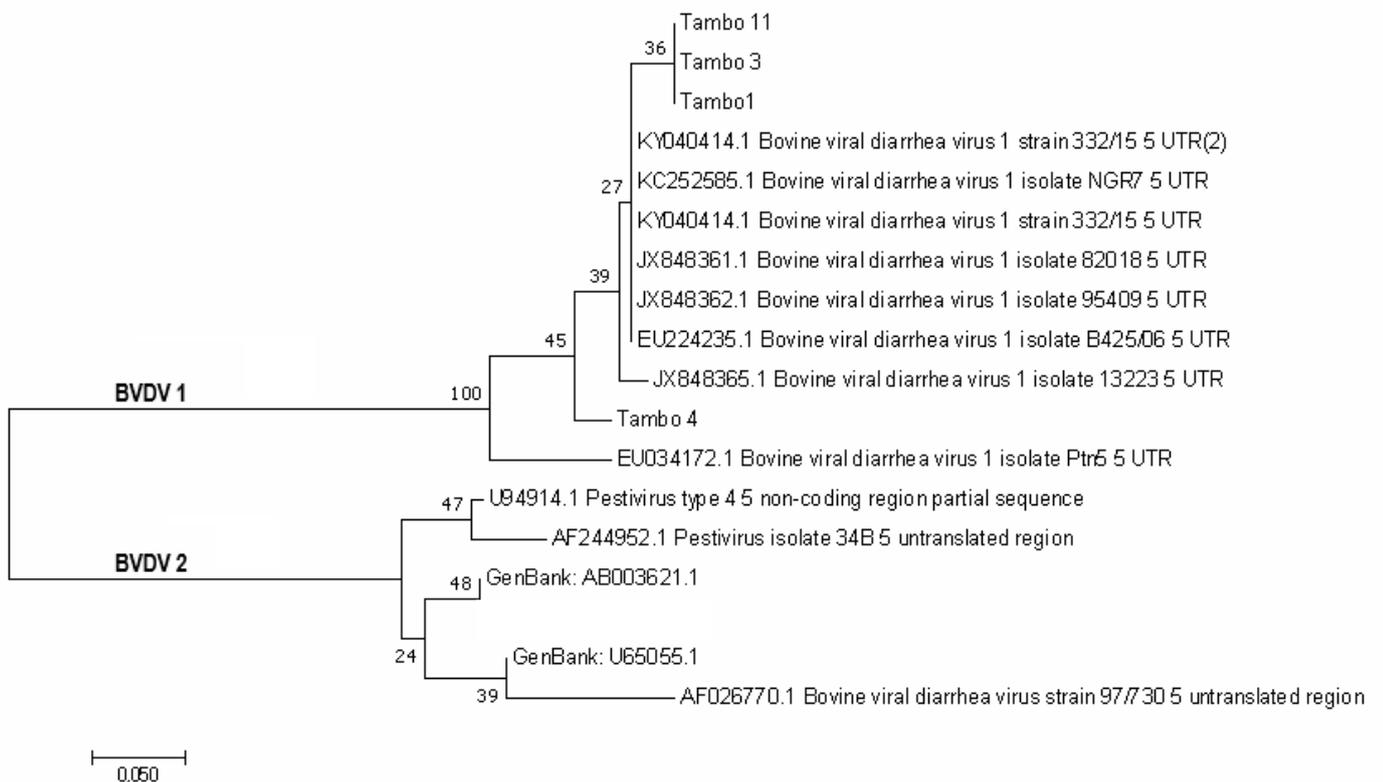


Fig. 26: Relaciones evolutivas de los Taxones. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining [343]. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque, se muestran junto a las ramas (100 replicaciones), [136]. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Maximum Composite Likelihood [377] y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 [211].

Presencia de bovinos infectados con *N. caninum* y VDVB (coinfecciones)

Analizamos luego la existencia de casos de coinfección entre el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y *N. caninum* en los bovinos evaluados en los 16 tambos, utilizando los datos serológicos. No encontramos una asociación estadística entre ambas enfermedades para cada animal (Fig. 27). La prueba de contingencia de Fisher arrojó un valor de $p=0.74$, confirmando la falta de relación significativa entre la presencia de VDVB y *N. caninum* en estos animales.

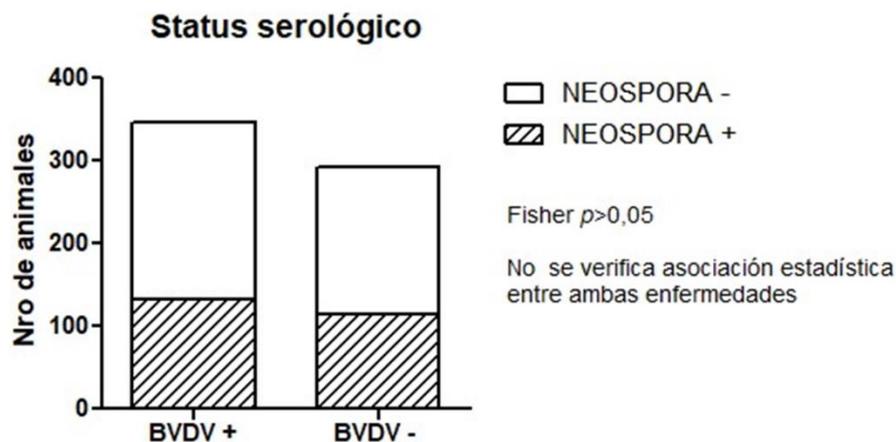


Fig. 27: Análisis de coinfecciones en los bovinos de los tambos de la CLVSA.

Discusión

El impacto económico del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en la industria ganadera a nivel mundial es considerable. La producción de carne y leche se ve afectada negativamente por este agente patógeno, especialmente en términos de pérdidas reproductivas, siendo el aborto una manifestación crucial de esta problemática [178, 210, 325].

Aunque se detectaron casos de aborto en los tambos examinados, los resultados no establecieron una asociación directa entre la seroprevalencia del VDVB y la incidencia de abortos. Esta falta de correlación sugiere la posibilidad de otros factores etiológicos contribuyendo al fenómeno del aborto en el ganado. Se debe considerar la intervención de agentes infecciosos y no infecciosos, incluyendo la relación entre la carencia de yodo [154] y las enfermedades reproductivas, aspectos que no fueron explorados en este

estudio. Resulta fundamental destacar que la provincia de Salta, debido a sus características geográficas, se considera un área carente de yodo. La insuficiencia de yodo en la dieta puede tener implicaciones significativas en la salud reproductiva del ganado bovino [252], añadiendo otra capa de complejidad a la problemática. Sin embargo, es necesario mencionar que este estudio no exploró detalladamente estos aspectos, lo que representa una limitación en la comprensión completa de los factores que podrían contribuir a la tasa de abortos en los bovinos de la región.

Por otra parte, se destaca una diferencia significativa en la tasa de aborto entre los establecimientos que emplean inseminación artificial exclusiva (IA) y aquellos que combinan IA con repaso por toros. Esta disparidad podría ser atribuida a la presencia de toros portadores del VDVB [145], o bien a otros agentes etiológicos transmitidos por vía venérea [299]. Es importante notar que este estudio no evaluó muestras de suero o semen de toros para detectar la presencia del VDVB u otras enfermedades venéreas, lo que limita la comprensión completa de la transmisión de agentes infecciosos relacionados con el aborto.

Es de suma importancia resaltar que el análisis realizado en la CLVSA puso de manifiesto una seroprevalencia del VDVB del 57%. Además, se identificó la presencia de animales persistentemente infectados (PI) en una proporción del 2.18% intra-rodeo y un 0.9% por tambo. Estos resultados están en consonancia con investigaciones previas realizadas tanto en Argentina como en otros países [180].

En consonancia con la situación global, tanto a nivel mundial como en Argentina, el VDVB y el parásito *N. caninum* emergen como dos de los más importantes agentes causantes de pérdidas reproductivas del ganado bovino [56, 258]. Los resultados de nuestro estudio han demostrado que no existe una asociación estadística entre ambas enfermedades en cada animal. Cuando lo comparamos con estudios similares realizados en otros países por ejemplo Suecia [52], se han reportado la relación de estos patógenos con el aborto en bovinos. En el caso de Suecia se identificó una baja seroprevalencia de *N. caninum* (2%), contrastando con una seroprevalencia más alta del VDVB (32%). Dentro del grupo de vacas que experimentaron abortos en explotaciones ganaderas con historial de complicaciones abortivas, se identificó que un 7% (26/378) presentaba anticuerpos contra *N. caninum*, y un significativo 42% (153/378) exhibía anticuerpos contra el VDVB. De manera interesante, se observó que dos de las vacas que habían sufrido abortos y que también mostraban seropositividad hacia *N. caninum*, presentaban a su vez anticuerpos contra VDVB. Por lo tanto, la detección de coinfecciones entre *N. caninum* y VDVB pone de relieve la complejidad epidemiológica de estas enfermedades.

Además, la variabilidad genética del VDVB es evidente [394]. En los aislamientos obtenidos de los tambos del Valle de Lerma, mostraron mayor predominancia por la cepa

VDVB-1b. El hecho de que la cepa VDVB-1b sea la más preponderante en los aislamientos analizados es coherente con las tendencias observadas en estudios previos [394]. Este predominio genético tiene implicaciones significativas para la selección de estrategias de control y prevención, incluyendo la elección de vacunas adecuadas. Dado que muchas de las vacunas disponibles comercialmente contienen el genotipo VDVB-1a. Teniendo además en cuenta que no siempre los anticuerpos contra virus del genotipo 1a brindan reactividad cruzada con los del genotipo VDVB-1b [141, 157, 313] esta diferencia genética resalta la importancia de seleccionar una vacuna que tenga en cuenta la cepa circulante predominante en la región para garantizar una protección efectiva.

Por todo lo descrito anteriormente, estos resultados ponen en manifiesto la circulación del VDVB en esta cuenca y sugiere una propagación generalizada del virus en el ganado bovino lechero. Una seroprevalencia tan sustancial destaca la necesidad de abordar el control y la prevención de la infección por el VDVB en la región. Además, proporciona información valiosa sobre la magnitud del problema y la importancia de considerar estrategias de control efectivas para mitigar el impacto del virus en la producción ganadera. Con lo cual, resulta necesario implementar programas de vacunación (programas utilizados para erradicar la circulación de VDVB o disminuir su incidencia a nivel productivo y reproductivo).

Conclusión

- El Valle de Lerma presenta infecciones endémicas por el VDVB con alta seroprevalencia y circulación del VDVB del genotipo 1b.
- Como factor de riesgo se destaca el repaso con toros como práctica de inseminación y la ausencia de medidas de manejo, como la identificación y remoción de animales PI, y la falta de vacunación.

CAPITULO 4

EXPERIENCIA DE CONTROL DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) BASADO EN EL DIAGNÓSTICO Y LA VACUNACIÓN EN UN TAMBO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE, ARGENTINA

Objetivos

Evaluar la eficacia a campo de una vacuna contra el virus de la Diarrea Viral Bovina en tambos (Suardí, Santa Fe) seleccionado previamente.

Establecer la capacidad de la vacunación de causar una disminución del número de abortos y evaluar una merma en la aparición de nuevos infectados.

Materiales y métodos específicos

Diseño experimental y trabajo a campo

El estudio se llevó a cabo en dos tambos (n=1150 bovinos incluidos los terneros) ubicados en el departamento de San Cristóbal, provincia de Santa Fe (**Fig. 28**), en las coordenadas 30°11'58.8"S 61°52'52.9"W durante el periodo 2018 a 2020 inclusive. Ambos utilizan un sistema de producción de pastoreo con Suplementación, contaban con antecedentes de problemas reproductivos (abortos) y serología positiva a VDVB informando por medición de anticuerpos anti-NS3. Los diagnósticos previos al estudio se realizaron en diversos laboratorios de diagnóstico privados habilitados por la autoridad sanitaria argentina (SENASA). Los bovinos eran de raza Holando de diferentes categorías: vacas, vaquillonas preñadas, terneros presentes y terneros nacidos durante el período de los ensayos criados en guacheras a estaca.

El tambo 1 contaba con 749 animales, siendo 309 la población del tambo 2. Inicialmente fueron 92 terneros los muestreados los que no se separaron por tambo ya que al nacer todos formaban parte en el mismo espacio físico, la "guachera".

Se realizaron los siguientes procesos secuenciales en ambos tambos (**Fig. 29**) (1) Evaluación de la presencia de virus y anticuerpos contra el VDVB en la totalidad del rodeo; (2) Identificación de animales con infección persistente; (3) Segregación de animales PI; (4) Vacunación de toda la población no PI, (5) Seguimiento de la respuesta inmune inducida por la vacuna, según esquema de vacunación reproductivo habitual; (6) Monitoreo del estado inmunológico de los animales, parámetros reproductivos y estado de salud general; y (7) Toma de muestra post vacunación: se toma una muestra del 30% de los animales, seleccionados al azar, a los 21 días de concluido el primer esquema de vacunación (**Fig. 29**).

Los datos de abortos al inicio del muestro en año 2019 eran del 30% y 26% para los tambos 1 y 2 respectivamente. Los tambos comprendieron bovinos clasificados en categorías (vacas, vaquillonas preñadas, terneros presentes y terneros nacidos durante el período del ensayo, criados en guacheras a estaca). Además, estos tambos presentaban serodiagnóstico positivo previo al VDVB (datos no mostrados).

Se utilizó una vacuna (descrita detalladamente en materiales y métodos generales) combinada inactivada que contenía la cepa del VDVB 1a.

La vacuna se aplicó por vía subcutánea en la tabla del cuello a razón de 2ml/dosis. Todos los animales del tambo 1 y 2 sin infección persistente fueron vacunados con 2 dosis separadas 21 días entre ellas. Posterior vacunación al año (**Fig. 29**).

Evaluación del estado serológico del rodeo e identificación de bovinos PI

En todas las muestras obtenidas de los bovinos incluidos en este estudio, se analizó la seroprevalencia y la identificación de animales con infección persistente. La interpretación de los resultados de análisis para el VDVB en lo referente a presencia de anticuerpos específicos y de antígenos virales que se detallan en la **tabla 10**.

Aquellos animales que dieron un resultado serológico negativo, antes de considerarse como tal, se les sometió a análisis para identificar PI (**Tabla 10**). Aquellos animales que dieron un resultado positivo a presencia de antígenos virales (PI), para confirmar este resultado y evitar un falso positivo por tratarse de un animal con infección aguda, se les repitió el muestreo y análisis de detección de antígenos virales a los 21 posteriores al primer muestreo (**Tabla 10**). A los 90 días posteriores a la vacunación de toda la población no PI, se les tomó muestra de sangre a n=20 bovinos vacunados para evaluar títulos vacunales. A los 12 meses de iniciado el protocolo de identificación de PI, segregación de PI y vacunación, se tomaron muestras de sangre a n=50 terneros comprendidos en tambo 1 y 2 (25 terneros por tambo) **Fig. 29**.



Fig.28: Tambos ubicados en la localidad de Suardi (provincia de Santa Fe). El Tambo 1 (A) contó con la presencia de $n=749$ bovinos mientras que el tambo 2 (B) presentó $n=309$ bovinos.

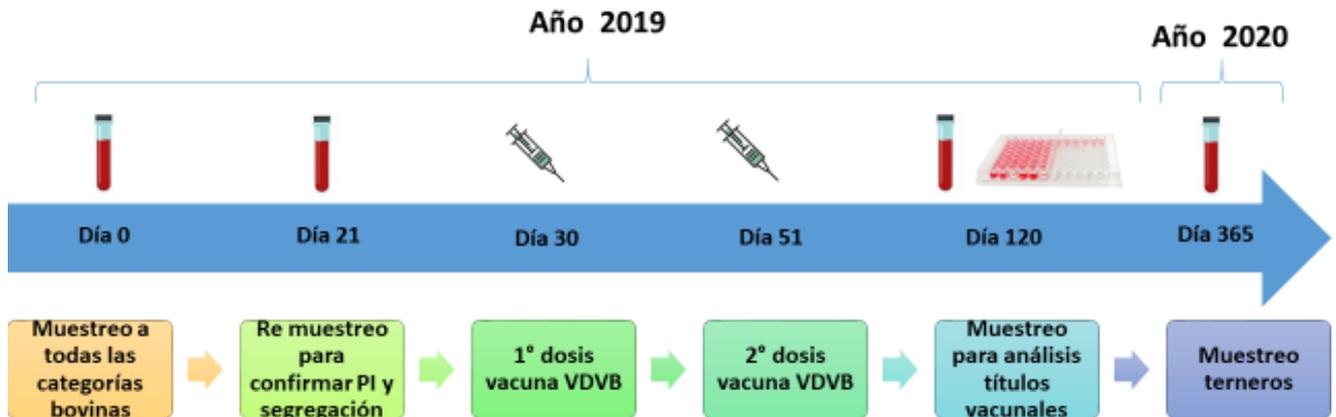


Fig. 29: Cronograma del Ensayo en Tambos de Santa Fe.

Resultados

Diagnóstico de la infección viral

Se seleccionaron dos tambos en el departamento de San Cristóbal, provincia de Santa Fe, que habían tenido casos confirmados de infección por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y presentaban problemas reproductivos asociados. Los tambos, denominados "Tambo 1" y "Tambo 2", tenían una población de 749 y 309 animales, respectivamente. Esta población incluía vacas, vaquillonas y terneros (**Tabla 10**).

Se determinó la presencia de anticuerpos contra la proteína NS3 y el antígeno NS3 en suero y epitelio auricular utilizando kits comerciales. Las muestras de suero también fueron evaluadas para presencia de genoma viral mediante RT-PCR anidada para detectar una región del 5'UTR [374]. La concordancia entre las mediciones realizadas por RT-PCR anidada y ELISA de antígeno en epitelio auricular fue excelente ($K=0.89$), para suero la concordancia fue moderada cuando el suero tenía anticuerpos anti-VDVB ($K=0.47$) y excelente para los sueros sin anticuerpos (animales PI, $K=0.95$).

El análisis de anticuerpos contra la proteína no-estructural NS3 por ELISA en el tambo 1 arrojó una seroprevalencia del 49,7% en vacas y vaquillonas no preñadas y del 62% para vaquillonas preñadas siendo la prevalencia de PI en vacas no preñadas del 2,4% y del 3% en vaquillonas preñadas. La seroprevalencia del tambo 1 fue del 56% y la prevalencia de PI del 2,5%.

En el tambo 2 la seroprevalencia fue del 58,7% en vacas y vaquillonas no preñadas, del 87% en vaquillonas preñadas, siendo la prevalencia de PI en vacas y vaquillonas no preñadas del 1,9% y del 1,8% en vaquillonas preñadas. En ambos tambos el mayor número de animales seropositivos se encontraron en el grupo de vaquillonas preñadas.

El porcentaje de animales PI considerando todos los animales de todas las categorías y ambos tambos fue del 2.4 % (**Tabla 10**).

La seroprevalencia en terneros fue del 2%, encontrándose 3 terneros con infección persistente lo que supone el 3,3% de prevalencia de PI.

Al agrupar todas las categorías en cada tambo, la seroprevalencia del tambo 1 resultó del 56% y el porcentaje de bovinos PI del 2,5%, mientras que, la seroprevalencia del tambo 2 fue del 63,4% y el porcentaje de bovinos PI del 2,2%. Podemos describir que la seroprevalencia promedio a VDVB de ambos tambos fue del 58,4% y la prevalencia de bovinos PI del 2,4%.

Aplicación de medidas de control

Todos los animales PI fueron excluidos de los tambos en estudio, enviados a un tercer tambo situado a varios kilómetros de los tambos 1 y 2 a fin de evitar el contagio. La totalidad de los animales sin infección persistente de los tambos 1 y 2 fueron inmunizados con dos dosis de vacuna comercial aplicadas con 21 días de intervalo entre ellas. Luego de la aplicación cada dosis de vacuna se observó una merma en la producción de leche que se recupera a niveles normales a las 24h (no se muestra). A los 90 días post-vacunación (dpv) se tomaron al azar 20 muestras para medir niveles de anticuerpos neutralizantes utilizando la cepa vacunal VDVB 1^a Singer (**Fig. 29**). Los niveles de anticuerpos específicos neutralizantes se incrementaron significativamente en todos los animales evaluados entre los 0 y los 90 dpv. El título promedio de anticuerpos neutralizantes alcanzado a los 90 dpv fue de $\text{Log}_{10}\text{Tit}^{-1} = 2.02$ con un desvío estándar de 0.32; contra un valor promedio de 1.5 (SD=0.31) a los 0 dpv (**Fig. 30**). En 2020 se continuó con el análisis de detección del genoma del VDB en muestras de terneros de madres que habían sido vacunadas. Los análisis arrojaron resultados negativos. Todos los animales fueron revacunados en 2019 y 2020. No se detectaron abortos asociados a VDVB ni terneros PI en 2020 (**Tabla 11**).

La tasa de concepción que era del 25% al iniciar el estudio, aumentó hasta un 55% en los tambos en los que se aplicó el tratamiento (no se muestra). El porcentaje de abortos disminuyó de forma progresiva en ambos tambos luego de la segregación de bovinos PI y la vacunación (**Fig. 31**). Los valores de partida en 2019 eran del 30 y 26% para los tambos 1 y 2 respectivamente. Los porcentajes de aborto disminuyeron entre 3 y 4 puntos en 2020, hasta terminar en 2021 con un porcentaje de abortos del 24% para el tambo 1 y 20%, en el tambo 2. Se observó un aumento de los casos de neosporosis y abortos debidos a esta infección parasitaria (no se muestra).

| | Categoría | | | | | | | | |
|---------|--------------------------------------|---------|--------|----------------------|-------|--------|-------|---------|--------|
| | Vacas y Vaquillonas (no preñadas) | | | Vaquillonas preñadas | | | Total | | |
| | N | SP | PI | N | SP | PI | N | SP | PI |
| TAMBO 1 | 649 | 322 | 16 | 100 | 62 | 3 | 749 | 422 | 19 |
| | | (49.7%) | (2,4%) | | (62%) | (3%) | | (56%) | (2.5%) |
| TAMBO 2 | 262 | 154 | 5 | 47 | 41 | 1 | 309 | 196 | 7 |
| | | (58.7%) | (1,9%) | | (87%) | (2,1%) | | (63,4%) | (2,2%) |
| | | | | | | | 1058 | 618 | 26 |
| | | | | | | | | (58.4%) | (2,4%) |

Tabla 10: Seroprevalencia del VDVB en ambos tambos clasificados por categorías bovinas. N= total de bovinos, SP= seroprevalencia, PI= persistentemente infectados.

| Terneros | Año 2019 | Año 2020 |
|-------------|----------|----------|
| N° muestras | 90 | 50 |
| N° PI | 3 | 0 |
| PI % | 3,3 | 0 |

Tabla 11: Descripción del número de terneros PI durante los años que incluyó el ensayo.

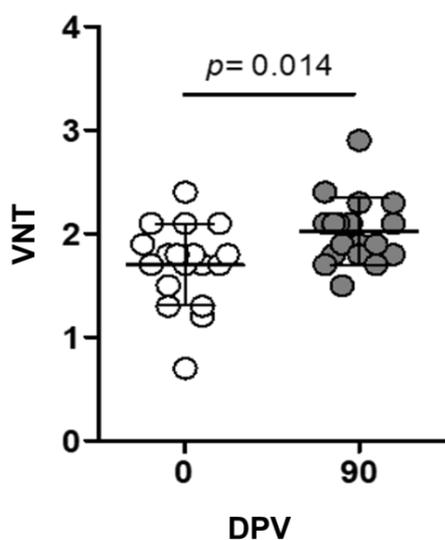


Fig. 30: Cada punto corresponde a una muestra individual. Las líneas se indican valores promedio \pm desvío estándar. Titulado en microplacas sobre células MDBK, método de estimación del título: Reed y Muench. VTN; títulos neutralizantes. DPV; días post vacunación.

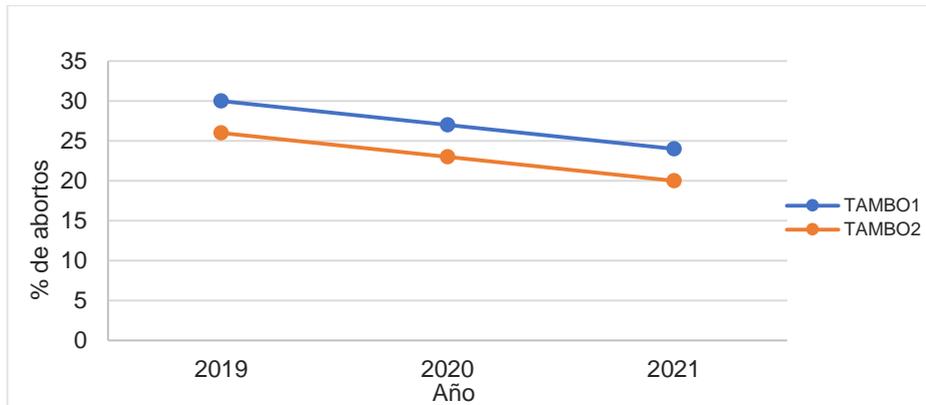


Fig. 31: Porcentaje de abortos bovinos en ambos tambos.

Discusión

La implementación de programas de control y/o erradicación ha demostrado que los países que los adoptan presentan, en promedio, una prevalencia agrupada de VDVB un 1,5 veces menor en animales y rebaños en comparación con aquellos países que no toman medidas de intervención [333]. Este hallazgo nos impulsó a evaluar la viabilidad de establecer medidas de control en condiciones de campo con las herramientas de diagnóstico y las vacunas disponibles en el mercado.

Además, las experiencias previas en otros países señalan que la adopción de prácticas sistemáticas y programas de control bien coordinados tiene un potencial claro de éxito en términos de mejorar la salud y productividad [372]. En áreas con baja seroprevalencia y densidad poblacional, generalmente no se emplean vacunas [47], que sí se utilizan en zonas con alto riesgo de reintroducción viral [197]. Estos antecedentes nos motivaron a evaluar la factibilidad de establecer medidas de control en condiciones de campo, en dos tambos representativos del sistema productivo nacional ubicados en la provincia de Santa Fe. Para el caso de este estudio y debida la alta seroprevalencia de ambos tambos (superiores al 50% y porcentajes de PI mayores al 2%) se optó por sumar al plan de control la vacunación sistemática, tomando el modelo alemán [181]. La estrategia aplicada consistió en combinar medidas de manejo, diagnóstico y vacunación para reducir la circulación del VDVB (**Fig. 29**) y mitigar el impacto de esta enfermedad viral en la tasa de abortos y la merma productiva.

Las pruebas diagnósticas son fundamentales para todas las campañas de control y erradicación. En este trabajo utilizamos las pruebas de diagnóstico para el diagnóstico de

VDVB para clasificar el estado del rebaño (ELISA de anticuerpos anti-NS3), pruebas para identificar animales infectados con VDVB y monitoreo continuo para confirmar el estado libre de VDVB (ELISA de antígeno y RT-nested PCR) Además se sumó la seroneutralización viral como medida de eficacia vacunal. Los ELISAs comerciales utilizados resultaron ser eficientes en la detección de antígeno viral y anticuerpos con la finalidad de identificar bovinos PI y segregarlos. No hubo diferencias en el diagnóstico individual mediante ELISA de antígeno o RT PCR anidada (no se muestra), aunque la RT-PCR anidada nos permitió trabajar con “pooles” de 20 muestras, según datos previos de nuestro laboratorio. Para detectar antígenos en muestras de suero sugerimos chequear previamente la ausencia de anticuerpos en la muestra. No observamos interferencia de anticuerpos en muestras de epitelio auricular (datos no mostrados).

El 51% de los animales del tambo 1 presentaron serología positiva al VDVB, mientras que este valor fue del 74 % para el Tambo 2. Los valores de seropositividad encontrados son similares a los reportados en diferentes países [179]. En los bovinos, los anticuerpos pasivos no son detectados pasados los seis meses de edad dado que su vida media es de 21 días aproximadamente [70], por lo que los anticuerpos detectados en estos animales habrían sido inducidos por el virus circulante en el campo, diseminado principalmente por los animales PI; ya que un animal PI es capaz de infectar al 90% o más animales del establecimiento en un lapso de dos a tres meses [180]. El porcentaje de animales PI en ambos tambos fue alto (>1.6%) según la categorización realizada en el meta análisis realizado por Scharnböck y col. [333] lo cual es esperable en regiones en las que circula el virus y no se aplican medidas de mitigación.

Es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y para el feto [197], es decir prevenir las infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI [64] y el testeo a los animales que ingresen al rebaño para prevenir el ingreso del virus. En este estudio se utilizó una vacuna comercial de alto título formulada con un adyuvante diseñado para alcanzar mayor respuesta inmune [278]. Con la aplicación de 2 dosis espaciadas por 21 días a toda la población no PI, los niveles de anticuerpos específicos neutralizantes en una muestra tomada al azar, se incrementaron significativamente en todos los animales evaluados entre los 0 y los 90 (días post vacunación) dpv. El título promedio de anticuerpos neutralizantes alcanzado a los 90 dpv fue de $\text{Log}_2\text{tit}^{-1} = 8$ con un desvío estándar de 0.32; contra un valor promedio de 2 (SD=0.31) a los 0 dpv. O sea que los títulos pre-vacunales se consideran bajos (“BAJOS” ≥ 2 y < 4 , mientras que la vacunación induce títulos en el rango “ALTO” ≥ 6 según la clasificación de Downey-Slinker y col. [107]. En dicho estudio evalúan la respuesta inducida por 2 dosis aplicadas con 21 días de intervalo obteniendo títulos similares a los medidos en este trabajo. El valor alcanzado a los 90 dpv es similar al medido post-infección

experimental con cepas VDVB-2 [356] y a la respuesta establecida para vacunas inactivadas combinadas en vacas preñadas a los 37 dpv [345].

Los casos de aborto (20 y 26%, tambos 1 y 2 respectivamente) al inicio del estudio presentaban valores comparables con los casos de explotaciones productivas reportadas con infección endémica [66, 325]. En este estudio si bien, hubo una notoria disminución en el porcentaje de abortos, no podemos descartar otros agentes etiológicos que también son causales de abortos en en nuestro país [76]. Datos de nuestro laboratorio indican que en los casos en lo que pudo analizarse tejido del feto abortado y/o placenta, nunca se detectó genoma del VDVB, pero sí se identificó en uno de los fetos la presencia de *N. caninum*, otro agente etiológico de abortos muy prevalente en nuestro país [297]. Es importante considerar otras posibles causas de problemas reproductivos en el ganado bovino, ya sean infecciosas o no infecciosas, incluyendo deficiencias nutricionales [347].

La tasa de preñez post-inseminación mejoró en los tambos al aplicar las medidas de control. Valores similares a los obtenidos en nuestro estudio fueron publicados anteriormente. La reducción en la fertilidad fue documentada a campo, en un rebaño infectado con el VDVB, donde se encontró que las tasas de concepción eran del 78.6 por ciento en las vacas inmunes y apenas del 22% en animales infectados [376]. En otro estudio se demostró que la infección por el VDVB en el momento de la concepción redujo las tasas de preñez a los 77 días. Mientras que la tasa de preñez fue del 79% en los animales de control, en el grupo expuesto al virus fue del 33% [249].

Nuestros resultados muestran que el trabajo coordinado de identificación de animales infectados persistentemente, con posterior segregación de éstos, sumado a la vacunación sistemática de toda la población susceptible (**Tabla 10**) en condiciones de campo con alta seroprevalencia para el VDVB, se asocia a una mejora en los parámetros reproductivos con una disminución en la tasa de abortos y eliminación de la presencia de VDVB circulante. La vacuna comercial aplicada logró aumentar los niveles poblacionales de anticuerpos seroneutralizantes del rodeo. A la fecha, los tambos en los que se realizó este ensayo cuentan con los mismos protocolos antes descritos, siendo establecimientos sin la presencia de animales PI y con toda la población vacunada, condiciones en las que el VDVB ya no circula.

Conclusión

- Este es el primer reporte de un estudio controlado para el manejo de las infecciones por el VDVB realizado en la República Argentina
- Es posible mitigar el impacto de las infecciones causadas por el VDVB en el campo utilizando herramientas actualmente disponibles en nuestro país.

DISCUSION FINAL

El noroeste argentino (NOA) es la región donde la ganadería ha sufrido un crecimiento mayor en comparación con otras regiones de nuestro país. La ganadería en el NOA se ha incrementado, principalmente, debido a la expansión de monocultivos en el centro del país. La producción lechera de Salta se centra fundamentalmente en la región templada de explotación intensiva y dentro de ésta en el Valle de Lerma. La producción lechera en la cuenca del Valle de Lerma representa una de las economías regionales más relevantes para la provincia de Salta. Está constituida por 32 tambos que en promedio emplean alrededor de $7,7 \pm 2,9$ operarios/ tambo; alrededor de 200 familias viven de esta actividad [243]. Al iniciar este trabajo no se conocía el impacto de estas enfermedades infecciosas en la CLV Sa (*N. caninum* y VDVB), responsables de pérdidas reproductivas en los tambos de nuestro país y en el mundo [178, 258].

En esta tesis fue posible estimar por primera vez la seroprevalencia de *N. caninum* en la CLV Sa (16 tambos analizados). Encontramos una alta seroprevalencia de neosporosis de carácter endémico en los tambos de esta región, con un 100% de rodeos positivos y una prevalencia promedio intrarodeo del 35%, teniendo en cuenta además que el 43,7% de los tambos presentaron seroprevalencias superiores al 40% con anticuerpos predominantemente de baja avidéz, los que se relacionan con infecciones agudas. Estos valores son similares a los descritos para la región central de nuestro país, donde hallaron también una elevada circulación de *N. caninum*, con casi la totalidad de los rodeos lecheros muestreados positivos [135, 260].

No encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre la seroprevalencia de *N. caninum* en los rodeos y los datos productivos de estos, probablemente debido a que el manejo productivo y reproductivo es similar en la mayoría de los tambos. Hemos identificado una relación entre el porcentaje de abortos y el tipo de servicio, siendo el método de inseminación artificial (IA) el que presentó menor porcentaje de abortos en comparación con aquellos establecimientos que utilizaron IA sumado a la monta natural. Esta situación probablemente se deba a la transmisión de patógenos causales de aborto o de disminución de la concepción por vía venérea. La aplicación de inseminación artificial utilizando semen criopreservado y debidamente controlado permite reducir el impacto posibles infecciones transmitidas por el semen, entre las que se encuentra tanto VDVB como *N. caninum* [148], que son más difíciles de controlar en los animales.

Fue evidente la asociación positiva entre la seroprevalencia y la presencia de infecciones agudas en animales adultos, lo que sugiere que el principal mecanismo de dispersión de la enfermedad en esta región es la transmisión horizontal. La presencia de perros infectados (6 de los 16 tambos presentaron perros con serología positiva a *N.*

caninum), la ubicación geográfica (zonas bajas anegadizas) y el libre pastoreo serían los principales factores de riesgo con efecto sobre este tipo de transmisión.

Por otra parte, es conocido que tanto el perfil de inmunoglobulinas IgG1 como IgG2 se consideran importantes contribuyentes en la protección contra patógenos intracelulares y extracelulares [382]. Siempre existieron controversias en cuanto a la presencia de los diferentes subtipos de IgG y la infección congénita [10, 161, 382], tal como se describió más arriba. Nuestro estudio realizado en condiciones naturales caracterizó el perfil de respuesta inmune en vacas infectadas en forma crónica y terneros nacidos a término con infección congénita. En este trabajo pudimos establecer que un perfil inmunológico que combina mayores títulos de IgG1 que IgG2 anti-*N. caninum* con altos niveles sistémicos de IFN- γ estaría asociado a un menor riesgo de infección transplacentaria en novillas y vacas con infección crónica, mientras que, las madres que transmitieron el parásito a sus crías presentaron mayores títulos de IgG2 que IgG1 y ausencia de IFN- γ . Las técnicas utilizadas fueron puestas a punto para nuestros estudios, son de dilución única y por lo tanto de alto rendimiento y usan pocos microlitros de suero. Las mismas están disponibles a la comunidad. Este trabajo fue el primero en establecer esta asociación inmunológica con el riesgo de transmisión vertical, que puede ser sumamente útil para evaluar futuras vacunas y para caracterizar las infecciones en los animales, asistiendo al manejo.

Otro patógeno de gran importancia en la producción bovina es el VDVB. Tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. En este trabajo se estableció por primera vez la seroprevalencia de *N. caninum* en la cuenca lechera del Valle de Lerma. Se determinó una seroprevalencia promedio intrarodeo del 57%, y prevalencias superiores al 70% en la mayoría de los tambos analizados (8/16). Además, aplicando biología molecular se determinó una prevalencia intrarodeo del 2,18% de animales PI, y del 0,9% por tambo, cuyos resultados fueron descritos con valores similares en estudios realizados en otros países y en otras provincias de Argentina [296]. Los valores encontrados son consistentes con los reportados en otras zonas endémicas. Las encuestas realizadas en los diferentes países alcanzan niveles del 60 a 80% de bovinos seropositivos, mientras que el 0,5 a 2% de bovinos son persistentemente infectados (PI) [296].

A nivel global existe mayor circulación de la cepa VDVB-1 que VDVB-2 [394]. Aislamientos realizados en establecimientos bovinos de nuestro país, determinaron alta prevalencia del genotipo VDVB-1b [294, 350]. En nuestro estudio, pudimos determinar a partir del aislamiento de muestras positivas a PI, una alta homología (95%) con la cepa VDVB-1b. Este dato es importante a tener en cuenta a la hora de emplear un programa de vacunación contra este virus, ya que se ha establecido una mayor protección cuando

los animales se exponen al mismo genotipo con el cual han sido vacunados, que cuando se exponen a un genotipo diferente [292, 316].

Los países que han implementado programas de control y/o erradicación, tienen en promedio una prevalencia agrupada de VDVB 1,5 veces menor a nivel de animales y rebaños en comparación con países sin medidas de intervención. Esto nos motivó a evaluar la factibilidad de establecer medidas de control en condiciones de campo. Además, las experiencias pasadas aplicadas en otros países indican que las prácticas sistemáticas y los programas de control bien coordinados tienen un claro potencial de éxito en la salud y productividad [372]. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de la circulación de VDVB en nuestro país, y tomando como referencia las experiencias pasadas en los programas de control de erradicación de VDVB en otros países, se optó por emplear un programa basado en el diagnóstico, identificación y segregación de bovinos PI y vacunación sistemática similar al modelo alemán [181]. Se trabajó en dos tambos que contaban al iniciar el estudio un alto porcentaje de animales PI (>1.6% según la categorización realizada en el meta análisis realizado por Scharnböck y col. [333]) lo cual es esperable en regiones en las que circula el virus y no se aplican medidas de mitigación.

Utilizamos una vacuna comercial acuosa con un adyuvante inmunomodulador [278]. Con la aplicación de 2 dosis espaciadas por 21 días a toda la población no PI, los niveles de anticuerpos específicos neutralizantes en muestras tomada al azar, se incrementaron significativamente en todos los animales evaluados entre los 0 y los 90 (días post vacunación) dpv. Los títulos pre-vacunales se consideran bajos ("BAJOS" ≥ 2 y < 4 , mientras que la vacunación induce títulos en el rango "ALTO" ≥ 6 según la clasificación de Downey-Slinker y col. [107]. El valor alcanzado a los 90 dpv es similar al medido post-infección experimental con cepas VDVB-2 [356] y a la respuesta establecida para vacunas inactivadas combinadas en vacas preñadas a los 37 dpv [345].

Hemos determinado luego de esta experiencia que ambos establecimientos presentaron una disminución progresiva en el porcentaje de abortos y un aumento en la tasa de concepción post-inseminación. Si bien, hubo una notoria disminución en el porcentaje de abortos, no podemos descartar otros agentes etiológicos infecciosos y no infecciosos que también son causales de abortos en regiones endémicas y en nuestro país [76, 252].

En conjunto, este trabajo no solamente ha aportado datos de seroprevalencia, que son imprescindibles para conocer el estado sanitario de los tambos, sino que también hemos brindado información adicional básica y aplicada.

En relación a *N. caninum*, fue sumamente relevante, tanto para poder realizar estudios de inmuno-epidemiología a campo como para el desarrollo de vacunas, establecer cuál es el perfil de respuesta inmune en vacas infectadas por *N. caninum* que se pueden asociar

con la posibilidad de ocurrencia de transmisión vertical. En zonas con alta seroprevalencia donde la mayoría de las hembras en servicio estarán infectadas de forma crónica, conocer estos parámetros puede ser de enorme ayuda a la hora de implementar medidas adecuadas de manejo. Por otro lado, conocer el perfil inmunológico necesario para evitar la transmisión vertical es un aporte al conocimiento de la inmunidad contra este parásito que impactará seguramente en el desarrollo de vacunas.

En cuanto al VDVB, brindamos datos de seroprevalencia, cepa circulante y una prueba de principios de cómo implementar medidas de control combinando manejo, diagnóstico y vacunación. Nunca se había evaluado esta metodología de trabajo en tambos de nuestro país.

CONCLUSIONES

- Esta tesis demuestra, por primera vez, la presencia de bovinos seropositivos a *N. caninum* en la cuenca lechera del Valle de Lerma, provincia de Salta, con un 100% de rodeos positivos, y describe por primera vez la circulación del virus de la Diarrea Viral Bovina del genotipo 1b en esta zona.
- Los resultados presentados sugieren que el principal mecanismo de dispersión de la Neosporosis en esta región sería la transmisión horizontal. La presencia de perros infectados, la ubicación geográfica particular de determinadas producciones y el libre pastoreo serían los principales factores de riesgo con efecto sobre este tipo de transmisión. Esta información es relevante para el diseño de estrategias de manejo tendientes a controlar la enfermedad en esta región.
- Definimos un perfil inmunológico asociado con riesgo de transmisión vertical. Nuestros resultados indican que mayores títulos de IgG1 que IgG2 anti-*N.caninum* con altos niveles sistémicos de IFN- γ está asociado con un menor riesgo de infección transplacentaria en novillas y vacas con infección crónica. Esta información es sumamente importante para establecer medidas de manejo y para el desarrollo de vacunas.
- Este trabajo de tesis reporta, por primera vez, un estudio controlado para el manejo de las infecciones por el VDVB realizado en la República Argentina utilizando las herramientas diagnósticas y las vacunas disponibles en el mercado
- Verificamos la factibilidad de reducir el impacto de las infecciones por el VDVB en tambos aplicando diagnóstico, manejo y vacunación. La identificación de animales infectados persistentemente a VDVB, con posterior segregación de estos, sumado a la vacunación sistemática de toda la población susceptible en condiciones de campo, se asoció a una mejora en los parámetros reproductivos con una disminución en la tasa de abortos, aumento en la tasa de concepción y eliminación de la circulación viral.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Adler, H. et al. 1996. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *Journal of Virology*. 70, 4 (Apr. 1996), 2650–2653. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.70.4.2650-2653.1996>.
- [2] Afshar, A. et al. 1991. Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 55, 1 (1991), 91.
- [3] Agapov, E. V. et al. 2004. Uncleaved NS2-3 Is Required for Production of Infectious Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Journal of Virology*. 78, 5 (Mar. 2004), 2414–2425. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2414-2425.2004>.
- [4] Aguado-Martínez, A. et al. 2008. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 157, 3–4 (Nov. 2008), 182–195. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.002>.
- [5] Aguirreburualde, M.S.P. et al. 2013. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 151, 3–4 (Feb. 2013), 315–324. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.004>.
- [6] Al-Qassab, S. et al. 2010. A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Molecular and Cellular Probes*. 24, 1 (Feb. 2010), 20–26. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.08.002>.
- [7] Al-Qassab, S. et al. 2009. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Molecular and Cellular Probes*. 23, 3–4 (2009), 132–139. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.01.006>.
- [8] Almería, S. et al. 2010. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Veterinary Parasitology*. 169, 3–4 (May 2010), 304–311. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.044>.
- [9] Almería, S. et al. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 107, 4 (Aug. 2002), 287–294. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00162-0).
- [10] Almería, S. et al. 2009. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 130, 1–2 (Jul. 2009), 35–42. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.01.003>.
- [11] Almería, S. and López-Gatius, F. 2013. Bovine neosporosis: Clinical and practical

- aspects. *Research in Veterinary Science*. W.B. Saunders.
- [12] Alves Neto, A.F. et al. 2011. Viability of Sporulated Oocysts of *Neospora caninum* After Exposure to Different Physical and Chemical Treatments. *Journal of Parasitology*. 97, 1 (Feb. 2011), 135–139. DOI:<https://doi.org/10.1645/GE-2571.1>.
- [13] Anderson, M.L. et al. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 207, 9 (Nov. 1995), 1206–10.
- [14] Anderson, M.L. et al. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* (Jul. 2000), 417–431.
- [15] Andrianarivo, A. et al. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitology Research 2001 87:10*. 87, 10 (2001), 817–825. DOI:<https://doi.org/10.1007/S004360100442>.
- [16] Andrianarivo, A.G. et al. 2000. A POLYGEN(TM)-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *International Journal for Parasitology*. 30, 9 (Aug. 2000), 985–990. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00088-6).
- [17] Atkinson, R. et al. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today*.
- [18] Baintner, K. 2007. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier.
- [19] Baker, D.G. et al. 1995. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*. 81, 5 (1995), 783–785. DOI:<https://doi.org/10.2307/3283975>.
- [20] Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- [21] Baker, J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (Nov. 1995), 425–445. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6).
- [22] Barkema, H.W. et al. 2001. Uitbraak van bovine virus diarrhoea op Nederlandse rundveebedrijven na vaccinatie met een met BVDV type 2 gecontamineerd BHV1 markervaccin. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. 126, 6 (Mar. 2001), 158–165.
- [23] Barlow, R.M. et al. 1986. Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *The Veterinary Record*. 118, 12 (Mar. 1986), 321–324. DOI:<https://doi.org/10.1136/VR.118.12.321>.
- [24] Barr, B.C. et al. 1992. *Neospora*-like protozoa infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest*. 4, (1992), 365–367.

- [25] Barr, B.C. et al. 1991. *Neospora* -like Protozoal Infections Associated with Bovine Abortions. *Veterinary Pathology*. 28, 2 (Mar. 1991), 110–116. DOI:<https://doi.org/10.1177/030098589102800202>.
- [26] Barratt, J. et al. 2008. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. *Molecular and Cellular Probes*. 22, 4 (Aug. 2008), 228–233. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.MCP.2008.03.001>.
- [27] Barrett, D. et al. 2022. BVD seroprevalence in the Irish cattle population as the national BVD programme progresses toward eradication. *BMC Veterinary Research*. 18, 1 (Dec. 2022), 1–11. DOI:<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03318-0>.
- [28] Barrington, G.M. and Parish, S.M. 2001. Bovine neonatal immunology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 17, 3 (Nov. 2001), 463–476. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30001-3).
- [29] de Barros, L.D. et al. 2018. *Neospora caninum* in birds: A review. *Parasitology International*. Elsevier Ireland Ltd.
- [30] Barros, S.C. et al. 2006. Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*. 118, 1–2 (Jun. 2006), 192–195. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.12.009>.
- [31] Bartels, C.J.M. et al. 2006. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*. 77, 3–4 (Dec. 2006), 186–198. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2006.07.003>.
- [32] Bartels, C.J.M. et al. 2007. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Veterinary Parasitology*. 148, 2 (Sep. 2007), 83–92. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2007.06.004>.
- [33] Bártová, E. et al. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. 142, 1–2 (Nov. 2006), 150–153. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.06.022>.
- [34] Bártová, E. and Sedlák, K. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. *Parasitology*. 138, 11 (2011), 1369–1371. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182011001041>.
- [35] Basso, W. et al. 2009. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary Parasitology*. 160, 1–2 (Mar. 2009), 43–50. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.10.085>.

- [36] Baszler, T. V. et al. 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 12 (1999), 4059–4064. DOI:<https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.4059-4064.1999>.
- [37] Baszler, T. V. et al. 1999. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*. 29, 10 (Oct. 1999), 1635–1646. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00141-1).
- [38] Bauermann, F. V. and Ridpath, J.F. 2015. HoBi-like viruses - The typical “atypical bovine pestivirus.” *Animal Health Research Reviews*. 16, 1 (Jun. 2015), 64–69. DOI:<https://doi.org/10.1017/S146625231500002X>.
- [39] BC, B. et al. 1994. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 71, 2 (Aug. 1994), 236–242.
- [40] Becher, P. et al. 1998. Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep. *Journal of Virology*. 72, 6 (Jun. 1998), 5165–5173. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.72.6.5165-5173.1998>.
- [41] Becher, P. et al. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology*. 262, 1 (Sep. 1999), 64–71. DOI:<https://doi.org/10.1006/viro.1999.9872>.
- [42] Becher, P. et al. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology*. 78, 6 (1997), 1357–1366. DOI:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1357>.
- [43] Becher, P. et al. 2001. RNA Recombination between Persisting Pestivirus and a Vaccine Strain: Generation of Cytopathogenic Virus and Induction of Lethal Disease. *Journal of Virology*. 75, 14 (Jul. 2001), 6256–6264. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6256-6264.2001>.
- [44] Bendfeldt, S. et al. 2003. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* (Nov. 2003), 313–326.
- [45] Bergeron, N. et al. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Canadian Veterinary Journal*. 41, 6 (2000), 464–469.
- [46] Bielefeldt-Ohmann, H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (Nov. 1995), 447–476. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30461-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30461-8).
- [47] Bitsch, V. et al. 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Veterinary Microbiology*. 77, 1–2 (Nov. 2000), 137–143.

- DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00270-4).
- [48] Bitsch, V. and Rønsholt, L. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (Nov. 1995), 627–640. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30471-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30471-0).
- [49] Bjerås, I. et al. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 70, 2 (1984), 271–274.
- [50] Bjerås, I. and Dubey, J.P. 1991. Evidence that Neospora Caninum is Identical to the Toxoplasma-like Parasite of Norwegian Dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 32, 3 (Sep. 1991), 407. DOI:<https://doi.org/10.1186/BF03546972>.
- [51] Björkman, C. et al. 1999. An IgG Avidity ELISA to Discriminate between Recent and Chronic Neospora Caninum Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11, 1 (Jan. 1999), 41–44. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063879901100106>.
- [52] Björkman, C. et al. 2000. Neospora caninum and Bovine Virus Diarrhoea Virus Infections in Swedish Dairy Cows in Relation to Abortion. *Veterinary Journal*. 159, 2 (Mar. 2000), 201–206. DOI:<https://doi.org/10.1053/tvj.1999.0446>.
- [53] Björkman, C. et al. 1996. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 208, 9 (May 1996), 1441–1444.
- [54] Boger, L.A. and Hattel, A.L. 2003. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 113, 1 (Apr. 2003), 1–6. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00041-4).
- [55] Bolin, S.R. and Grooms, D.L. 2004. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- [56] Bolin, S.R. and Ridpath, J.F. 1990. Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus with bovine neutrophils and mononuclear leukocytes before and after treatment with trypsin. *American Journal of Veterinary Research*. 51, 11 (1990), 1847–1851.
- [57] Boysen, P. et al. 2006. The protozoan Neospora caninum directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infection and Immunity*. 74, 2 (Feb. 2006), 953–960. DOI:<https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.953-960.2006>.
- [58] Brackenbury, L.S. et al. 2003. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary Microbiology* (Nov. 2003), 337–344.
- [59] Brandtzaeg, P. 2003. Mucosal immunity: Integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* (Jul. 2003), 3382–3388.
- [60] Brito, B.P. et al. 2014. Accuracy of traditional and novel serology tests for predicting cross-protection in foot-and-mouth disease vaccinated cattle. *Vaccine*. 32, 4 (Jan. 2014), 433–436. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2013.12.007>.

- [61] Brock, K. V. 2004. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. W.B. Saunders.
- [62] Brock, K. V. 2003. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. 31, 2 (Jun. 2003), 133–135. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00029-0).
- [63] Brodersen, B.W. and Kelling, C.L. 1999. Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. *Viral Immunology*. 12, 4 (1999), 323–334. DOI:<https://doi.org/10.1089/vim.1999.12.323>.
- [64] Brownlie, J. et al. 2000. Bovine virus diarrhoea virus - strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*. 22, 4 (Apr. 2000), 176–187. DOI:<https://doi.org/10.1136/INPRACT.22.4.176>.
- [65] Brownlie, J. 1985. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In practice*. 7, 6 (Nov. 1985), 195–202. DOI:<https://doi.org/10.1136/inpract.7.6.195>.
- [66] Brownlie, J. et al. 1989. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in veterinary science*. 46, 3 (May 1989), 307–311. DOI:[https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)31171-8](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)31171-8).
- [67] Brownlie, J. et al. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *The Veterinary record*. 114, 22 (Jun. 1984), 535–536. DOI:<https://doi.org/10.1136/vr.114.22.535>.
- [68] Brusckhe, C.J.M. et al. 1997. A subunit vaccine based on glycoprotein 2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*. 15, 17–18 (Dec. 1997), 1940–1945. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00125-4).
- [69] Bucafusco, D. et al. 2015. Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN- γ responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology*. 476, (Feb. 2015), 11–18. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.11.023>.
- [70] Bucafusco, D. et al. 2014. Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*. 32, 48 (Nov. 2014), 6576–6582. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.056>.
- [71] Burns, W.R. et al. 2005. Recruitment of CXCR3+ and CCR5+ T Cells and Production of Interferon- γ -Inducible Chemokines in Rejecting Human Arteries. *American Journal of Transplantation*. 5, 6 (Jun. 2005), 1226–1236. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.1600-6143.2005.00892.X>.
- [72] Buxton, D. et al. 2001. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunology*. 23, 2 (Feb. 2001), 85–91. DOI:<https://doi.org/10.1046/J.1365-3024.2001.00362.X>.

- [73] Buxton, D. et al. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 118, 4 (May 1998), 267–279. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(07\)80003-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(07)80003-X).
- [74] Buxton, D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today*. 9, 9 (Jan. 1993), 335–337. DOI:[https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90236-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90236-9).
- [75] Campbell, J.R. 2004. Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- [76] Campero, C.M. et al. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications*. 27, 5 (Jul. 2003), 359–369. DOI:<https://doi.org/10.1023/A:1024754003432>.
- [77] Campero, C.M. et al. 2007. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 150, 1–2 (Nov. 2007), 155–158. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2007.09.002>.
- [78] Campero, C.M. et al. 2003. Serological Status and Abortion Rate in Progeny Obtained by Natural Service or Embryo Transfer from *Neospora caninum*-Seropositive Cows. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 50, 9 (Nov. 2003), 458–460. DOI:<https://doi.org/10.1046/j.0931-1793.2003.00698.x>.
- [79] Campero, L.M. et al. 2018. An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Tropical Animal Health and Production*. 50, 1 (Jan. 2018), 75–84. DOI:<https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-x>.
- [80] Campero, L.M. et al. 2015. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Experimental Parasitology*. 155, (Aug. 2015), 8–12. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.009>.
- [81] Canada, N. et al. 2006. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 139, 1–3 (Jun. 2006), 109–114. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.02.014>.
- [82] Canada, N. et al. 2002. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *Journal of Parasitology*. 88, 6 (2002), 1247–1248. DOI:[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1247:iovtgf\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1247:iovtgf]2.0.co;2).
- [83] Capozzo, A.V.E. et al. 1997. Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine*. 15, 6–7 (Apr. 1997), 624–630. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00284-8).

- [84] Caspe, S.G. et al. 2012. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Veterinary Parasitology*. 189, 2–4 (Oct. 2012), 171–181. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.034>.
- [85] Chase, C.C.L. et al. 2015. Immune response to bovine viral diarrhoea virus - Looking at newly defined targets. *Animal Health Research Reviews*. 16, 1 (2015), 4–14. DOI:<https://doi.org/10.1017/S1466252315000110>.
- [86] Chase, C.C.L. et al. 2004. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: A constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- [87] Chase, C.C.L. 2013. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*. 41, 1 (Jan. 2013), 52–60. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009>.
- [88] Chatterjee, P. et al. 2014. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. 0, MAY (2014), 253. DOI:<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00253>.
- [89] Cheadle, M. et al. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *JSTOR*.
- [90] Choi, K.H. et al. 2006. The Structure of Bovine Viral Diarrhoea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Its Amino-Terminal Domain. *Structure*. 14, 7 (Jul. 2006), 1107–1113. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.str.2006.05.020>.
- [91] Collantes-Fernández, E. et al. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 40, 4 (2002), 1194–1198. DOI:<https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1194-1198.2002>.
- [92] Collen, T. and Morrison, W.I. 2000. CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Research*. 67, 1 (Mar. 2000), 67–80. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00131-3).
- [93] Collett, M.S. et al. 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: The genomic organization of a pestivirus. *Virology*. 165, 1 (Jul. 1988), 200–208. DOI:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90673-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90673-3).
- [94] Corapi, W. V. et al. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196, 4 (1990), 590–596.
- [95] Cornish, T.E. et al. 2005. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17, 2 (2005), 110–117. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063870501700203>.

- [96] Cortese, V.S. 2009. Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- [97] Cortese, V.S. et al. 1998. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*. 59, 11 (1998), 1409–1413.
- [98] Courret, N. et al. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 107, 1 (Jan. 2006), 309–316. DOI:<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-02-0666>.
- [99] Couvreur, B. et al. 2007. Sequence-optimised E2 constructs from BVDV-1b and BVDV-2 for DNA immunisation in cattle. *Veterinary Research*. 38, 6 (2007), 819–834. DOI:<https://doi.org/10.1051/vetres:2007037>.
- [100] Davison, H.C. et al. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*. 29, 10 (Oct. 1999), 1683–1689. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00129-0).
- [101] Dijkstra, T. et al. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*. 31, 8 (2001), 747–752. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00230-2).
- [102] Dijkstra, T. et al. 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*. 31, 2 (Feb. 2001), 209–215. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00160-0).
- [103] Dion, S. et al. 2011. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 41, 6 (May 2011), 685–695. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.008>.
- [104] Dobbelaere, D.A.E. and Küenzi, P. 2004. The strategies of the *Theileria* parasite: A new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends.
- [105] Donahoe, S.L. et al. 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. Elsevier.
- [106] Donofrio, G. et al. 2008. Double immunization strategy with a BoHV-4-vectorialized secreted chimeric peptide BVDV-E2/BoHV-1-gD. *Vaccine*. 26, 48 (Nov. 2008), 6031–6042. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.023>.
- [107] Downey-Slinker, E.D. et al. 2016. Antibody titers to vaccination are not predictive of level of protection against a BVDV type 1b challenge in *Bos indicus* - *Bos taurus* steers. *Vaccine*. 34, 42 (Sep. 2016), 5053–5059.

- DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.087>.
- [108] Dubey, J.P. et al. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*.
- [109] Dubey, J.P. et al. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193, 10 (1988), 1259–1263.
- [110] Dubey, J.P. et al. 2002. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends in Parasitology*. 18, 2 (Feb. 2002), 66–69. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02172-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02172-9).
- [111] Dubey, J.P. et al. 2017. *Neosporosis in animals*. CRC Press.
- [112] Dubey, J.P. et al. 1990. Neosporosis in Cats. *Veterinary Pathology*. 27, 5 (1990), 335–339. DOI:<https://doi.org/10.1177/030098589002700505>.
- [113] Dubey, J.P. et al. 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*. W.B. Saunders.
- [114] Dubey, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* (Aug. 1999), 349–367.
- [115] Dubey, J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*. Korean Society for Parasitology.
- [116] Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*.
- [117] Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology Research* 2000 86:2. 86, 2 (2000), 165–168. DOI:<https://doi.org/10.1007/S004360050027>.
- [118] Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2, 3 (1990), 230–233. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063879000200316>.
- [119] Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 1989. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *American journal of veterinary research*. 50, 9 (1989), 1578–1579. DOI:<https://doi.org/10.2307/3283062>.
- [120] Dubey, J.P. and Schares, G. 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Veterinary Parasitology*. 180, 1–2 (Aug. 2011), 90–108. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>.
- [121] Dubovi, E.J. 2013. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. 41, 1 (Jan. 2013), 8–13. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>.
- [122] Duffell, S.J. and Harkness, J.W. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *The Veterinary record*. 117, 10 (1985), 240–245. DOI:<https://doi.org/10.1136/vr.117.10.240>.

- [123] Duong, M.C. et al. 2008. Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *The Veterinary Journal*. 175, 3 (Mar. 2008), 390–394. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2006.01.016>.
- [124] Echaide, I. et al. 2002. Neosporosis bovina: Análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. (2002), PAR-01.
- [125] Edwards, S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*.
- [126] Edwards, S. and Paton, D. 1995. Antigenic differences among pestiviruses. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (1995), 563–577. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30467-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30467-9).
- [127] Elbers, K. et al. 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *Journal of Virology*. 70, 6 (Jun. 1996), 4131–4135. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.70.6.4131-4135.1996>.
- [128] Erdmann, A.A. et al. 2004. Co-stimulated/Tc2 cells abrogate murine marrow graft rejection. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 10, 9 (Sep. 2004), 604–613. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2004.06.006>.
- [129] Ezio, F. and Anna, T. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Veterinary Parasitology*. 115, 1 (Jul. 2003), 75–78. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00201-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00201-2).
- [130] Fernández, F. et al. 2009. Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhea in bovines, ovines and guinea pigs. *Revista Argentina de Microbiología*. 41, 2 (2009), 86–91.
- [131] Fernandez, F.M. et al. 1998. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*. 16, 5 (Mar. 1998), 507–516. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)80004-7).
- [132] Ferre, I. et al. 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*. 63, 5 (Mar. 2005), 1504–1518. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.002>.
- [133] Florencia, L. et al. 2014. FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Desarrollo de inmunógenos molecularmente diseñados para activar la respuesta protectora contra la neosporosis bovina. (2014).
- [134] Flores, E.F. et al. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*. 87, 1 (Jul. 2002), 51–60. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00080-1).
- [135] Fort, M. et al. 2015. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in la Pampa, Argentina. *Acta Parasitologica*. 60, 2 (Jun. 2015), 275–282.

DOI:<https://doi.org/10.1515/AP-2015-0039>.

- [136] Fourichon, C. et al. 2005. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 177–181.
- [137] Fray, M.D. et al. 2000. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science* (2000), 615–627.
- [138] Fredriksen, B. et al. 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* (Jan. 1999), 109–122.
- [139] Frössling, J. et al. 2005. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Veterinary Parasitology*. 128, 3–4 (Mar. 2005), 209–218. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.006>.
- [140] Fulton, R.W. et al. 2002. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: Predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 66, 3 (Jul. 2002), 181–190.
- [141] Fulton, R.W. et al. 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: Impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* (2003), 89–95.
- [142] Fulton, R.W. et al. 2009. Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 73, 2 (Apr. 2009), 117–124.
- [143] Gaede, W. et al. 2005. Nachweis und spezies-spezifische differenzierung von pestiviren mit der real-time RT-PCR. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 118, 3–4 (Mar. 2005), 113–120.
- [144] GARCÍA-MELO, D.P. et al. 2010. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology*. 137, 7 (Jun. 2010), 1057–1068. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182009991855>.
- [145] Gard, J.A. et al. 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*. 68, 3 (Aug. 2007), 434–442. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.003>.
- [146] Gibney, E.H. et al. 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International Journal for Parasitology*. 38, 5 (Apr. 2008), 579–588. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2007.09.015>.
- [147] Gil, L.H.V.G. et al. 2006. The Amino-Terminal Domain of Bovine Viral Diarrhoea Virus N pro Protein Is Necessary for Alpha/Beta Interferon Antagonism. *Journal of Virology*. 80, 2 (Jan. 2006), 900–911. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.900-911.2006>.
- [148] Givens, M.D. 2018. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle.

Animal. Cambridge University Press.

- [149] Glew, E.J. et al. 2003. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *Journal of General Virology*. 84, 7 (Jul. 2003), 1771–1780. DOI:<https://doi.org/10.1099/vir.0.18964-0>.
- [150] Gogorza, L.; Moran, P.; Larghi, J.; Iglesias, M. & Perez, A. 2001. Vacunación Contra La Diarrea Viral Bovina; Fortalezas Y Limitaciones. *Tesina*. 3, 2 (2001), 3.
- [151] Gómez-Romero, N. et al. 2021. Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico. *Archives of Virology*. 166, 7 (Jul. 2021), 1999–2003. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00705-021-05089-9>.
- [152] Gondim, L.S.Q. et al. 2010. Toxoplasma gondii and Neospora caninum in sparrows (Passer domesticus) in the Northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology*. 168, 1–2 (Feb. 2010), 121–124. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.055>.
- [153] González Altamiranda, E.A. et al. 2012. Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Animal Reproduction Science*. 133, 3–4 (Aug. 2012), 146–152. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.022>.
- [154] González, J. 1995. El yodo en la nutrición del ganado bovino. *Nutrición animal tropical*. 2, 1 (1995), 95–120.
- [155] Goodswen, S.J. et al. 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of Neospora caninum: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier.
- [156] Graham, D.A. et al. 1998. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Veterinary Journal*. 156, 2 (Sep. 1998), 149–154. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80045-0](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80045-0).
- [157] Grooms, D.L. et al. 2007. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhea virus fraction to cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 68, 12 (Dec. 2007), 1417–1422. DOI:<https://doi.org/10.2460/ajvr.68.12.1417>.
- [158] Guarino, A. et al. 2000. Neosporosis in water buffalo (Bubalus bubalis) in southern Italy. *Veterinary Parasitology*. 91, 1–2 (Jul. 2000), 15–21. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00239-9).
- [159] Gunn, G.J. et al. 2005. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 149–162.
- [160] Gutekunst, D.E. and Malmquist, W.A. 1964. Complement-Fixing And Neutralizing Antibody Response To Bovine Viral Diarrhea And Hog Cholera Antigens. *Canadian Journal of Comparative Medicine & Veterinary Science*. 28, 1 (1964), 19–23.

- [161] Guy, C.S. et al. 2001. Neospora caninum in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Veterinary Record*. 149, 15 (Oct. 2001), 443–449. DOI:<https://doi.org/10.1136/vr.149.15.443>.
- [162] Hakim, F.T. et al. 1991. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *The Journal of Immunology*. 147, 7 (1991).
- [163] Hall, C.A. et al. 2005. Neospora abortions in dairy cattle: Diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*. 128, 3–4 (Mar. 2005), 231–241. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.012>.
- [164] Hamers, C. et al. 2001. Diversity among Bovine Pestiviruses. *Veterinary Journal*. Bailliere Tindall Ltd.
- [165] Hamers, C. et al. 2002. Virus neutralizing antibodies against a 22 bovine isolates in vaccinated calves. *Vet J*. 163, (2002), 61–67.
- [166] Häsler, B. et al. 2006. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*. 77, 3–4 (Dec. 2006), 230–253. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.07.006>.
- [167] Hecker, Y.P. et al. 2014. A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 162, 3–4 (Dec. 2014), 142–153. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.001>.
- [168] Hecker, Y.P. et al. 2013. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. *Tropical Animal Health and Production* 2013 45:7. 45, 7 (Mar. 2013), 1645–1647. DOI:<https://doi.org/10.1007/S11250-013-0396-1>.
- [169] Heriazon, A. et al. 2011. Immunoglobulin isotypes of lactating Holstein cows classified as high, average, and low type-1 or -2 immune responders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 144, 3–4 (Dec. 2011), 259–269. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2011.08.023>.
- [170] Heuer, C. et al. 2007. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhoea virus on dairy herds in New Zealand. *Journal of Dairy Science*. 90, 12 (Dec. 2007), 5428–5438. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0258>.
- [171] Hewicker, M. et al. 1990. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*. 23, 1–4 (Jun. 1990), 203–210. DOI:[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90150-T](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90150-T).
- [172] Hilali, M. et al. 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*

- antibodies in sera from camels from Egypt. *Veterinary Parasitology*. 75, 2–3 (Feb. 1998), 269–271. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00181-7).
- [173] Hilbe, M. et al. 2007. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19, 1 (2007), 28–34. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063870701900105>.
- [174] Ho, M.S.Y. et al. 1997. Detection of Neospora from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 7 (1997), 1740–1745. DOI:<https://doi.org/10.1128/JCM.35.7.1740-1745.1997>.
- [175] Holmdahl, O.J.M. and Mattsson, J.G. 1996. Rapid and sensitive identification of Neospora caninum by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*. 112, 2 (1996), 177–182. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182000084742>.
- [176] Hornberg, A. et al. 2009. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Veterinary Microbiology*. 135, 3–4 (Mar. 2009), 205–213. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.068>.
- [177] Houe, H. et al. 1995. Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 7, 3 (1995), 327–332. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063879500700305>.
- [178] Houe, H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* (Jun. 2003), 137–143.
- [179] Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* (Jan. 1999), 89–107.
- [180] Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (1995), 521–547. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30465-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30465-5).
- [181] Houe, H. et al. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA.
- [182] Howard, C.J. et al. 1992. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. 32, (1992), 303–314.
- [183] Hughes, J.M. et al. 2008. Neospora caninum: Detection in wild rabbits and investigation of co-infection with Toxoplasma gondii by PCR analysis. *Experimental Parasitology*. 120, 3 (Nov. 2008), 255–260. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2008.07.011>.
- [184] Hulst, M.M. et al. 2001. Interaction of Classical Swine Fever Virus with Membrane-

- Associated Heparan Sulfate: Role for Virus Replication In Vivo and Virulence. *Journal of Virology*. 75, 20 (Oct. 2001), 9585–9595. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.75.20.9585-9595.2001>.
- [185] Hulst, M.M. and Moormann, R.J.M. 1997. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *Journal of General Virology*. 78, 11 (Nov. 1997), 2779–2787. DOI:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-11-2779>.
- [186] Huong, L.T.T. et al. 1998. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Veterinary Parasitology*. 75, 1 (Feb. 1998), 53–57. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00178-7).
- [187] Hyndman, L. et al. 1998. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *Journal of Virological Methods*. 71, 1 (Mar. 1998), 69–76. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00206-1).
- [188] Ibrahim, H.M. et al. 2009. Short report: Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80, 2 (2009), 263–267. DOI:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.263>.
- [189] Innes, E.A. et al. 2001. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *neospora caninum* in pregnant sheep. *Parasite Immunology*. 23, 3 (Mar. 2001), 121–132. DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00361.x>.
- [190] Innes, E.A. et al. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*. Elsevier Current Trends.
- [191] Innes, E.A. et al. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*. 31, 13 (Nov. 2001), 1523–1534. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00284-3).
- [192] Innes, E.A. et al. 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Oct. 2005), 29–36.
- [193] Iqbal, M. et al. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*. 81, 2 (2000), 451–459. DOI:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-451>.
- [194] Jakubek, E.B. et al. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*. 102, 1–2 (Dec. 2001), 167–172. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00513-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00513-1).
- [195] Jensen, L. et al. 1998. Experimental porcine neosporosis. *APMIS*. 106, 4 (Jan. 1998), 475–482. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01374.x>.
- [196] Jones, L.R. et al. 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*. 81, 4 (Aug. 2001), 367–375.

DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00367-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00367-4).

- [197] Kelling, C.L. 2004. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 20, 1 (Mar. 2004), 115–129. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.001>.
- [198] King, J.S. et al. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 40, 8 (2010), 945–950. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>.
- [199] King, J.S. et al. 2011. Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. *Veterinary Journal*. W.B. Saunders.
- [200] Klevar, S. et al. 2007. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *International Journal for Parasitology*. 37, 3–4 (Mar. 2007), 329–339. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.002>.
- [201] Koethe, S. et al. 2020. A synthetic modified live chimeric marker vaccine against bvdv-1 and bvdv-2. *Vaccines*. 8, 4 (Oct. 2020), 1–23. DOI:<https://doi.org/10.3390/vaccines8040577>.
- [202] Kovács, F. et al. 2003. The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Veterinary Microbiology*. 96, 2 (Oct. 2003), 117–131. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00209-8).
- [203] Kramps, J.A. et al. 1999. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Veterinary Microbiology* (Jan. 1999), 135–144.
- [204] Kumar, S. et al. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 7 (Jul. 2016), 1870–1874. DOI:<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>.
- [205] Lackner, T. et al. 2004. Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus. *Journal of Virology*. 78, 19 (Oct. 2004), 10765–10775. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10765-10775.2004>.
- [206] Lambert, H. et al. 2006. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular Microbiology*. 8, 10 (Oct. 2006), 1611–1623. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>.
- [207] Lambert, H. and Barragan, A. 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*. 12, 3 (Mar. 2010), 292–300. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2009.01417.X>.
- [208] Lambot, M. et al. 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of General Virology*. 78, 5 (May 1997), 1041–1047. DOI:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1041>.

- [209] Lanave, G. et al. 2017. Circulation of multiple subtypes of bovine viral diarrhoea virus type 1 with no evidence for HoBi-like pestivirus in cattle herds of southern Italy. *Infection, Genetics and Evolution*. 50, (Jun. 2017), 1–6. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.009>.
- [210] Lanyon, S.R. et al. 2014. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*. W.B. Saunders.
- [211] Lavoria, M. ángeles et al. 2012. Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine*. 30, 48 (Nov. 2012), 6845–6850. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.09.011>.
- [212] Lazar, C. et al. 2003. The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology*. 314, 2 (Sep. 2003), 696–705. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00510-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00510-5).
- [213] Liang, R. et al. 2008. DNA prime-protein boost strategies protect cattle from bovine viral diarrhoea virus type 2 challenge. *Journal of General Virology*. 89, 2 (Feb. 2008), 453–466. DOI:<https://doi.org/10.1099/vir.0.83251-0>.
- [214] Lindberg, A. and Houe, H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 55–73.
- [215] Lindsay, D. et al. 2001. Prevalence of Agglutinating Antibodies to *Neospora caninum* in Raccoons, *Procyon lotor*. *meridian.allenpress.com*. 87, 5 (2001), 1197–1198. DOI:[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1197:POAATN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1197:POAATN]2.0.CO;2).
- [216] Lindsay, D.S. 1995. Abortion, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum* Hemoprotzoal Diseases View project. *Article in American Journal of Veterinary Research*. (1995).
- [217] Lindsay, D.S. et al. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 82, 4 (May 1999), 327–333. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00054-0).
- [218] Lindsay, D.S. et al. 2001. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*. 87, 4 (2001), 909–911. DOI:[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0909:OEIDFM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0909:OEIDFM]2.0.CO;2).
- [219] Lindsay, D.S. et al. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*. 82, 4 (1996), 657–659. DOI:<https://doi.org/10.2307/3283798>.
- [220] LINDSAY, D.S. 2001. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. *Equine Veterinary Journal*. 33, 2 (Mar. 2001), 116–118. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.2042->

3306.2001.TB00588.X.

- [221] Lindsay, D.S. and Dubey, J.P. 1990. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *Journal of Parasitology*. 76, 2 (1990), 177–179. DOI:<https://doi.org/10.2307/3283010>.
- [222] Lindsay, D.S. and Dubey, J.P. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American journal of veterinary research*. 50, 11 (1989), 1981–1983.
- [223] Lindsay, D.S. and Dubey, J.P. 1989. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *The Journal of parasitology*. 75, 5 (1989), 772–779. DOI:<https://doi.org/10.2307/3283063>.
- [224] Liu, L. et al. 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*. 385, 2 (Mar. 2009), 351–357. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004>.
- [225] Long, M.T. and Baszler, T. V. 2000. Neutralization of Maternal IL-4 Modulates Congenital Protozoal Transmission: Comparison of Innate Versus Acquired Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 164, 9 (May 2000), 4768–4774. DOI:<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.9.4768>.
- [226] López-Gatius, F. et al. 2007. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology*. 68, 7 (Oct. 2007), 1067–1073. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.006>.
- [227] López-Gatius, F. et al. 2005. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 52, 3 (Apr. 2005), 147–152. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00831.x>.
- [228] Lundén, A. et al. 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*. 20, 11 (Nov. 1998), 519–526. DOI:<https://doi.org/10.1046/J.1365-3024.1998.00184.X>.
- [229] Macaldowie, C. et al. 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*. 131, 2–3 (Aug. 2004), 142–156. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.02.005>.
- [230] Macháčová, T. et al. 2013. Seroprevalence and risk factors of *Neospora* spp. in donkeys from Southern Italy. *Veterinary Parasitology*. 198, 1–2 (Nov. 2013), 201–204. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.08.013>.
- [231] Makoschey, B. et al. 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*. 31, 3 (Sep. 2003), 203–208. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00058-7).

- [232] Malacari, D.A. et al. 2018. In vitro and in vivo characterization of a typical and a high pathogenic bovine viral Diarrhea virus type II strains. *Frontiers in Veterinary Science*. 5, APR (Jan. 2018), 6–15. DOI:<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00075>.
- [233] Maley, S.W. et al. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: A 1-year study. *Veterinary Parasitology*. 96, 1 (Mar. 2001), 1–9. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00428-3).
- [234] Maley, S.W. et al. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: Inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*. 129, 2–3 (Aug. 2003), 186–195. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00032-X).
- [235] Mansilla, F.C. et al. 2020. Development and validation of a novel ELISA for the detection of *Neospora caninum* antibodies in bovine sera. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*. 7, 2 (2020), 204.
- [236] Mansilla, F.C. et al. 2013. Dose-dependent immunogenicity of a soluble *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in cattle. *Veterinary Parasitology*. 197, 1–2 (Oct. 2013), 13–21. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.04.040>.
- [237] Mansilla, F.C. et al. 2015. Safety and immunogenicity of a soluble native *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in pregnant cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 165, 1–2 (May 2015), 75–80. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2015.03.007>.
- [238] Mansilla, F.C. et al. 2012. The immune enhancement of a novel soy lecithin/ β -glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. *Vaccine*. 30, 6 (Feb. 2012), 1124–1131. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.007>.
- [239] De Marez, T. et al. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: Humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*. 29, 10 (Oct. 1999), 1647–1657. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00154-X).
- [240] Marin, R.E. et al. 2011. Relevamiento Seroepidemiológico de Enfermedades que Afectan la Reproducción en Bovinos de la Provincia de Jujuy. *Revista veterinaria argentina*. XXVIII, (2011), 1–8.
- [241] Marques, F.A.C. et al. 2011. *Neospora caninum*: Evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitology Research*. 108, 4 (Apr. 2011), 1015–1019. DOI:<https://doi.org/10.1007/S00436-010-2146-X/FIGURES/1>.
- [242] Marshall, D.J. et al. 1996. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology*. 33, 3 (1996), 311–318. DOI:<https://doi.org/10.1177/030098589603300308>.

- [243] Martínez, G.M. et al. 2020. Condiciones laborales de los asalariados tamberos “el caso de La Cuenca lechera del Valle de Lerma en Salta.” *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 46, 1 (2020), 123–132.
- [244] Marugan-Hernandez, V. 2017. Neospora caninum and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *Journal of Comparative Pathology*. W.B. Saunders Ltd.
- [245] Maya, L. et al. 2016. Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. *Archives of Virology*. 161, 3 (Mar. 2016), 529–535. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>.
- [246] McAllister, M.M. et al. 1996. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Veterinary Pathology*. 33, 6 (1996), 647–655. DOI:<https://doi.org/10.1177/030098589603300603>.
- [247] McAllister, M.M. 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. W.B. Saunders.
- [248] McAllister, M.M. et al. 1998. Dogs are definitive hosts of Neospora caninum. *International journal for parasitology*. 28, 9 (Sep. 1998), 1473–8.
- [249] McGowan, M.R. et al. 1993. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *The Veterinary record*. 133, 2 (1993), 39–43. DOI:<https://doi.org/10.1136/vr.133.2.39>.
- [250] Medawar, P.B. 1948. Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *British Journal of Experimental Pathology*. 29, 1 (1948), 58.
- [251] Mendez, E. et al. 1998. Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones: a Cellular Insert Determines NS3 Production and Viral Cytopathogenicity. *Journal of Virology*. 72, 6 (Jun. 1998), 4737–4745. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.72.6.4737-4745.1998>.
- [252] Micheloud, J.F. et al. 2019. Perinatal mortality in cattle associated with goitre. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 12, 2 (Jul. 2019), 48–52. DOI:<https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i2p48-52>.
- [253] Moen, A. et al. 2005. Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 93–98.
- [254] Moennig, V. et al. 2005. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Preventive Veterinary Medicine*. 72, 1–2 (Nov. 2005), 109–114. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.08.011>.
- [255] Moennig, V. et al. 1993. Prolonged Persistence of Cytopathogenic Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in a Persistently Viremic Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 40, 1–10 (Jan. 1993), 371–377. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1993.tb00152.x>.

- [256] Monney, T. and Hemphill, A. 2014. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? *Experimental Parasitology*. 140, 1 (May 2014), 52–70. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2014.02.015>.
- [257] Moore, D. et al. 2013. Neospora caninum causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Tropical Animal Health and Production*. 45, 5 (Jan. 2013), 1237–1241. DOI:<https://doi.org/10.1007/s11250-013-0353-z>.
- [258] Moore, D.P. 2005. Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology*. 127, 2 (Jan. 2005), 87–97. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.001>.
- [259] Moore, D.P. et al. 2003. Reproductive Losses due to Neospora caninum in a Beef Herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 50, 6 (Aug. 2003), 304–308. DOI:<https://doi.org/10.1046/J.1439-0450.2003.00673.X>.
- [260] Moore, D.P. et al. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of Neospora caninum in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 107, 4 (Aug. 2002), 303–316. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00129-2).
- [261] Moré, G. et al. 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for Sarcocystis cruzi and Neospora caninum in dairy cattle. *Veterinary Parasitology*. 160, 1–2 (Mar. 2009), 51–54. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.10.081>.
- [262] Moré, G. et al. 2008. Seroprevalence of Neospora caninum, Toxoplasma gondii and Sarcocystis sp. in llamas (Lama glama) from Jujuy, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 155, 1–2 (Aug. 2008), 158–160. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.04.003>.
- [263] Mósena, A.C.S. et al. 2017. Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i in Brazil. *Archives of Virology*. 162, 4 (Apr. 2017), 1119–1123. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00705-016-3199-7>.
- [264] Moskwa, B. et al. 2006. The first detection of Neospora caninum DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitology Research 2006 100:3*. 100, 3 (Oct. 2006), 633–636. DOI:<https://doi.org/10.1007/S00436-006-0288-7>.
- [265] Munoz, D.P. et al. 1996. Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. *British Veterinary Journal*. 152, 2 (Mar. 1996), 175–182. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(96\)80072-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(96)80072-8).
- [266] Nazir, M.M. et al. 2014. Neospora caninum prevalence in dogs raised under different living conditions. *Veterinary parasitology*. 204, 3–4 (Aug. 2014), 364–368. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.041>.
- [267] Nettleton, P.F. and Entrican, G. 1995. Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal*. W.B. Saunders.
- [268] Newcomer, B.W. and Givens, D. 2016. Diagnosis and Control of Viral Diseases of Reproductive Importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Academic Press Inc.

- [269] Nicolino, R.R. et al. 2017. Prevalence and risk factors associated with anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy herds in the central region of Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 10, (Dec. 2017), 71–74. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.008>.
- [270] Nishikawa, Y. et al. 2001. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8, 4 (2001), 811–817. DOI:<https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.811-817.2001>.
- [271] Nishikawa, Y. et al. 2001. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*. 123, 1 (2001), 25–31. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182001008095>.
- [272] Niskanen, R. 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *The Veterinary record*. 133, 14 (Oct. 1993), 341–344. DOI:<https://doi.org/10.1136/vr.133.14.341>.
- [273] Njaa, B.L. et al. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12, 5 (2000), 393–399. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063870001200501>.
- [274] Nobiron, I. et al. 2003. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*. 21, 17–18 (May 2003), 2082–2092. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00745-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00745-4).
- [275] O’Handley, R. et al. 2002. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology*. 88, 6 (2002), 1120–1123. DOI:[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1120:eioswn\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1120:eioswn]2.0.co;2).
- [276] Obando, C. et al. 1999. Serological and Molecular Diagnosis of Bovine Viral Diarrhoea Virus and Evidence of other Viral Infections in Dairy Calves with Respiratory Disease in Venezuela. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 40, 3 (Sep. 1999), 253–262. DOI:<https://doi.org/10.1186/BF03547023>.
- [277] Odeón, A.C. et al. 2003. Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 96, 2 (Oct. 2003), 133–144. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00210-4).
- [278] Oirschot, J.T.V. et al. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Veterinary Microbiology* (Jan. 1999), 169–183.

- [279] Okeoma, C.M. et al. 2005. Neospora caninum: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Experimental Parasitology*. 110, 1 (May 2005), 48–55. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2005.01.008>.
- [280] Okeoma, C.M. et al. 2004. The use of PCR to detect Neospora caninum DNA in the blood of naturally infected cows. *Veterinary Parasitology*. 122, 4 (Aug. 2004), 307–315. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2004.06.001>.
- [281] Orban, S. et al. 1983. Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus: I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 30, 1–10 (1983), 619–634. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.1983.TB01888.X>.
- [282] Ortega-Mora, L.M. et al. 2003. Detection of Neospora caninum in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*. 117, 4 (Nov. 2003), 301–308. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2003.09.015>.
- [283] Ortega-Mora, L.M. et al. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*. De Gruyter.
- [284] Ortega, D.O. et al. 2020. Prevalence and risk factors of bovine viral diarrhea in Colombian cattle. *Veterinary World*. 13, 8 (2020), 1487–1494. DOI:<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1487-1494>.
- [285] Osoro, K. et al. 2009. Natural breeding with bulls experimentally infected with Neospora caninum failed to induce seroconversion in dams. *Theriogenology*. 71, 4 (Mar. 2009), 639–642. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.09.035>.
- [286] Pabón, M. et al. 2007. Chronic Neospora caninum infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. *Veterinary Parasitology*. 147, 1–2 (Jun. 2007), 40–46. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.017>.
- [287] Paré, J. et al. 1996. Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calthood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 60, 2 (Apr. 1996), 133–139.
- [288] Paré, J. et al. 1997. Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *Journal of Parasitology*. 83, 1 (1997), 82–87. DOI:<https://doi.org/10.2307/3284321>.
- [289] Paré, J. et al. 1998. Seroepidemiologic study of Neospora caninum in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213, 11 (Dec. 1998), 1595–1598.
- [290] Parreño, V. et al. 2004. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 100,

- 1–2 (Jul. 2004), 7–24. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2004.02.007>.
- [291] Paton, D.J. et al. 1991. An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. *Journal of Virological Methods*. 31, 2–3 (Feb. 1991), 315–324. DOI:[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90169-Z](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90169-Z).
- [292] Paton, D.J. et al. 1999. Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. *Veterinary Microbiology* (1999), 185–196.
- [293] Payne, S. and Ellis, J. 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology*. 26, 4 (Apr. 1996), 347–351. DOI:[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00030-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00030-6).
- [294] Pecora, A. et al. 2014. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Research in Veterinary Science*. 96, 1 (Feb. 2014), 204–212. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>.
- [295] Pecora, A. et al. 2012. Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Veterinary Research Communications*. 36, 3 (May 2012), 157–164. DOI:<https://doi.org/10.1007/s11259-012-9526-x>.
- [296] Pecora, A. and Pérez Aguirreburualde, M.S. 2017. Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. *INTA Ediciones*. (2017).
- [297] Pereyra, R. et al. 2019. Evidence of reduced vertical transmission of *Neospora caninum* associated with higher IgG1 than IgG2 serum levels and presence of IFN- γ in non-aborting chronically infected cattle under natural condition. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 208, (2019), 53–57. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.01.001>.
- [298] Pescador, C.A. et al. 2007. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*. 150, 1–2 (Nov. 2007), 159–163. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.028>.
- [299] Peter D 1997. Bovine venereal diseases. *Current therapy in large animal theriogenology*. 355–63.
- [300] Peterhans, E. et al. 2003. BVDV and innate immunity. *Biologicals* (Jun. 2003), 107–112.
- [301] Peters, M. et al. 2001. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Veterinary Parasitology*. 97, 2 (May 2001), 153–157. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00401-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00401-0).
- [302] Pizarro-Lucero, J. et al. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology*. 115, 1–3 (Jun. 2006), 208–217. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.009>.
- [303] Potgieter, L.N. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 11, 3 (1995), 501–520.

- DOI:[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30464-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30464-3).
- [304] Puentes, R. et al. 2016. Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Veterinary Research*. 12, 1 (Jun. 2016). DOI:<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0749-x>.
- [305] Reed J, L. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 27, (1938), 493–497.
- [306] Regidor-Cerrillo, J. et al. 2011. In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary Research*. 42, 1 (Feb. 2011), 1–11. DOI:<https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-41>.
- [307] Regidor-Cerrillo, J. et al. 2010. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Veterinary Research*. 41, 4 (Jul. 2010), 52. DOI:<https://doi.org/10.1051/vetres/2010024>.
- [308] Regidor-Cerrillo, J. et al. 2006. MULTILOCUS MICROSATELLITE ANALYSIS REVEALS EXTENSIVE GENETIC DIVERSITY IN *NEOSPORA CANINUM*. *Journal of Parasitology*. 92, 3 (Jun. 2006), 517–524. DOI:<https://doi.org/10.1645/GE-713R.1>.
- [309] Reichel, M.P. 2000. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Australian Veterinary Journal*. John Wiley & Sons, Ltd.
- [310] Reinhardt, G. et al. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhea/mucosal disease in southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine*. 10, 1–2 (Dec. 1990), 73–78. DOI:[https://doi.org/10.1016/0167-5877\(90\)90052-J](https://doi.org/10.1016/0167-5877(90)90052-J).
- [311] Ribeiro, C.M. et al. 2019. Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. *Tropical Animal Health and Production*. Springer.
- [312] Ribo, J. and Sáez, J. 1997. Infección Por *Neospora Caninum* En Un Perro: Descripción de un caso clínico. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales (Avepa)*. 17, 2 (1997), 106–112.
- [313] Ridpath, J.F. 2010. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier.
- [314] Ridpath, J.F. 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*. 41, 1 (Jan. 2013), 14–19. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.003>.
- [315] Ridpath, J.F. et al. 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Veterinary Microbiology*. 114, 3–4 (May 2006), 196–204. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.059>.
- [316] Ridpath, J.F. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 17–30.
- [317] Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. 1995. Delayed Onset Postvaccinal Mucosal Disease as a

- Result of Genetic Recombination between Genotype 1 and Genotype 2 BVDV. *Virology*. 212, 1 (Sep. 1995), 259–262. DOI:<https://doi.org/10.1006/VIRO.1995.1480>.
- [318] Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 12, 2 (Apr. 1998), 101–106. DOI:<https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0158>.
- [319] Ridpath, J.F. and Neill, J.D. 2000. Detection and Characterization of Genetic Recombination in Cytopathic Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses. *Journal of Virology*. 74, 18 (Sep. 2000), 8771–8774. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8771-8774.2000>.
- [320] Rinaldi, L. et al. 2006. Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. *Parasitology Research* 2006 100:2. 100, 2 (Oct. 2006), 359–364. DOI:<https://doi.org/10.1007/S00436-006-0335-4>.
- [321] Rojo-Montejo, S. et al. 2009. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Veterinary Research*. 40, 5 (Sep. 2009), 1–10. DOI:<https://doi.org/10.1051/vetres/2009032>.
- [322] Rojo-Montejo, S. et al. 2009. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary Parasitology*. 159, 1 (Jan. 2009), 7–16. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.10.009>.
- [323] Romero, J.J. et al. 2004. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Veterinary Parasitology*. 123, 3–4 (Sep. 2004), 149–159. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.016>.
- [324] Rosbottom, A. et al. 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*. 29, 4 (Apr. 2007), 219–228. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2007.00936.X>.
- [325] Rüfenacht, J. et al. 2001. The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. *Theriogenology*. 56, 2 (Jul. 2001), 199–210. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00556-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00556-8).
- [326] Sabatini, D. et al. 2013. Cuantifican pérdidas económicas por enfermedades reproductivas. *Seminario Sustentabilidad y modernización de la ganadería Argentina* (2013).
- [327] Sager, H. et al. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*. 102, 1–2 (Dec. 2001), 1–15. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00524-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00524-6).
- [328] Sager, H. et al. 2005. Mise en évidence d'un cas de «abortion storm» (transmission transplacentaire exogène de *Neospora caninum*) dans une exploitation de vaches laitières: une première en Suisse. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 147, 3 (Mar.

- 2005), 113–120. DOI:<https://doi.org/10.1024/0036-7281.147.3.113>.
- [329] Saini, S.S. et al. 2007. Structural evidence for a new IgG1 antibody sequence allele of cattle. *Scandinavian Journal of Immunology*. 65, 1 (Jan. 2007), 32–38. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01865.x>.
- [330] Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology* (Jan. 1999), 123–134.
- [331] Sandvik, T. 2005. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Preventive Veterinary Medicine*. 72, 1–2 (Nov. 2005), 3–16. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.08.015>.
- [332] Schares, G. et al. 2002. p38-avidity-ELISA: Examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*. 106, 4 (Jul. 2002), 293–305. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00103-6).
- [333] Scharnböck, B. et al. 2018. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Scientific Reports*. 8, 1 (Sep. 2018), 1–15. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32831-2>.
- [334] Schetters, T. 2004. Intervet symposium: Bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology* (Oct. 2004), 137–146.
- [335] Schetters, T.P.M. et al. 2009. Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: A review. *Journal of the South African Veterinary Association*.
- [336] Schweizer, M. et al. 2006. “Self” and “Nonself” Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. *Journal of Virology*. 80, 14 (Jul. 2006), 6926–6935. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.02443-05>.
- [337] Schweizer, M. and Peterhans, E. 2001. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *Journal of Virology*. 75, 10 (May 2001), 4692–4698. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.75.10.4692-4698.2001>.
- [338] Scott, H.M. et al. 2007. Seroprevalence of and agroecological risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and *Neospora caninum* infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 48, 4 (Apr. 2007), 397–406.
- [339] Scott, H.M. et al. 2006. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Canadian Veterinary Journal*. 47, 10 (Oct. 2006), 981–991.

- [340] Sedlák, K. et al. 2014. Seroprevalence of *Neospora caninum* in cats from the Czech Republic. *Acta Parasitologica* 2014 59:2. 59, 2 (May 2014), 359–361. DOI:<https://doi.org/10.2478/S11686-014-0246-Y>.
- [341] Sentsui, H. et al. 1998. Anti-Viral Effect of Interferon- α on Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Veterinary Medical Science*. 60, 12 (1998), 1329–1333. DOI:<https://doi.org/10.1292/jvms.60.1329>.
- [342] Serrano-Martínez, E. et al. 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*. 67, 4 (Mar. 2007), 729–737. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.004>.
- [343] Sharman, P.A. et al. 2010. Chasing the golden egg: Vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- [344] Da Silva, N. et al. 1995. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhea virus genome in semen. *Journal of Virological Methods*. 55, 2 (Oct. 1995), 209–218. DOI:[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)00059-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)00059-4).
- [345] Smith, B.I. et al. 2015. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*. 76, 10 (Oct. 2015), 913–920. DOI:<https://doi.org/10.2460/AJVR.76.10.913>.
- [346] Soares, R.M. et al. 2011. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. *Veterinary Parasitology*. 175, 1–2 (Jan. 2011), 168–172. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.09.022>.
- [347] Spain, J.N. et al. 2006. Effects of Nutrition on Reproduction in Dairy Cattle. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology: Second Edition*. 442–450.
- [348] SPEER, C.A. and DUBEY, J.P. 1989. Ultrastructure of Tachyzoites, Bradyzoites and Tissue Cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of Protozoology*. 36, 5 (Sep. 1989), 458–463. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01081.x>.
- [349] Spellberg, B. and Edwards, J.E. 2001. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*.
- [350] Spetter, M.J. et al. 2021. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhea virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*. 96, (Dec. 2021), 105089. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105089>.
- [351] St-Louis, M.C. et al. 2005. The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Veterinary Research*. 36, 2 (Mar. 2005), 213–227. DOI:<https://doi.org/10.1051/vetres:2004059>.

- [352] Ståhl, K. et al. 2009. Diversidade genética de vírus da diarreia viral bovina (BVDV) do Peru e Chile. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 29, 1 (Jan. 2009), 41–44. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100006>.
- [353] Staska, L.M. et al. 2005. Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected Holstein cattle. *Infection and Immunity*. 73, 3 (Mar. 2005), 1321–1329. DOI:<https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1321-1329.2005>.
- [354] Staska, L.M. et al. 2003. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infection and Immunity*. 71, 6 (Jun. 2003), 3272–3279. DOI:<https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3272-3279.2003>.
- [355] STROHBUSCH, M. et al. 2009. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. *Parasite Immunology*. 31, 7 (Jul. 2009), 366–372. DOI:<https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2009.01112.X>.
- [356] Strong, R. et al. 2018. Establishment of a bovine viral diarrhea virus type 2 intranasal challenge model for assessing vaccine efficacy. *Frontiers in Veterinary Science*. 5, FEB (Feb. 2018), 24. DOI:<https://doi.org/10.3389/FVETS.2018.00024/BIBTEX>.
- [357] Studer, E. et al. 2002. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biologicals*. 30, 4 (Dec. 2002), 289–296. DOI:<https://doi.org/10.1006/biol.2002.0343>.
- [358] Suarez, V.H. and Martinez, G.M. 2015. Características generales de los tambos. *Características y problemáticas productivas - sanitarias de la lechería del Valle de Lerma (Salta)*. 66.
- [359] Subauste, C.S. et al. 1991. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *The Journal of Immunology*. 147, 11 (1991).
- [360] Suthanthiran, M. and Strom, T.B. 1995. Immunobiology and immunopharmacology of organ allograft rejection. *Journal of Clinical Immunology* 1995 15:4. 15, 4 (Jul. 1995), 161–171. DOI:<https://doi.org/10.1007/BF01541085>.
- [361] Tautz, N. et al. 1997. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *Journal of Virology*. 71, 7 (Jul. 1997), 5415–5422. DOI:<https://doi.org/10.1128/jvi.71.7.5415-5422.1997>.
- [362] Taylor, L.F. et al. 1997. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Canadian Veterinary Journal*. 38, 1 (Jan. 1997), 29–37.
- [363] Thomas, C. et al. 2009. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine*. 27, 17 (Apr.

- 2009), 2387–2393. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.02.010>.
- [364] Thulke, H.H. et al. 2018. Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. *Preventive Veterinary Medicine*. 150, (Feb. 2018), 151–161. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.017>.
- [365] Topliff, C.L. and Kelling, C.L. 1998. Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhoea virus isolates. *Virology*. 250, 1 (Oct. 1998), 164–172. DOI:<https://doi.org/10.1006/viro.1998.9350>.
- [366] Trono, K.G. et al. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Veterinary Microbiology*. 83, 3 (Nov. 2001), 235–248. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00420-5).
- [367] Truppel, J.H. et al. 2010. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitology International*. 59, 3 (Sep. 2010), 376–379. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2010.05.001>.
- [368] Uzeda, R.S. et al. 2007. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *The Korean Journal of Parasitology*. 45, 4 (2007), 295. DOI:<https://doi.org/10.3347/KJP.2007.45.4.295>.
- [369] Valle, P.S. et al. 2005. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: A cost-benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 189–207.
- [370] VanLeeuwen, J.A. et al. 2010. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*. 94, 1–2 (Apr. 2010), 54–64. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012>.
- [371] Venturini, M.C. et al. 1999. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International Journal for Parasitology*. 29, 10 (Oct. 1999), 1705–1708. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00143-5).
- [372] De Verdier Klingenberg, K. et al. 1999. Incidence of diarrhoea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhoea virus infection in a dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 214, 12 (Jun. 1999), 1824–1828.
- [373] Vilček, S. et al. 2005. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* (Nov. 2005), 31–35.
- [374] Vilček, S. et al. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*. 136, 3–4 (Sep. 1994), 309–323. DOI:<https://doi.org/10.1007/BF01321060>.
- [375] Vilček, Š. 2001. Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera.

- Acta Virologica*. 45, 2 (2001), 81–86.
- [376] Virakul, P. et al. 1988. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology*. 29, 2 (Feb. 1988), 441–449. DOI:[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90246-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90246-4).
- [377] Walz, P.H. et al. 2001. Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *American Journal of Veterinary Research*. 62, 7 (Dec. 2001), 1095–1103. DOI:<https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1095>.
- [378] Wapenaar, W. et al. 2007. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*. 143, 2 (Jan. 2007), 166–173. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.007>.
- [379] Weaver, D.M. et al. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*.
- [380] Wegmann, T.G. et al. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*. 14, 7 (Jul. 1993), 353–356. DOI:[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90235-D](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D).
- [381] Welsh, M.D. et al. 1995. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet Immunol Immunopathol*. 46, (1995), 195–210.
- [382] Welsh, M.D. et al. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*. 114, 1 (Jan. 2005), 101–111. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02003.x>.
- [383] Wernike, K. et al. 2017. Eradication of bovine viral diarrhoea virus in Germany—Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Veterinary Microbiology*. 208, (Sep. 2017), 25–29. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.009>.
- [384] Weston, J.F. et al. 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 103, 2–3 (Feb. 2012), 136–144. DOI:<https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2011.08.010>.
- [385] Williams, D.J.L. et al. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*. 33, 10 (Sep. 2003), 1059–1065. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00143-7).
- [386] Williams, D.J.L. et al. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*. 121, 4 (Oct. 2000), 347–358.

DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182099006587>.

- [387] Williams, J.H. et al. 2002. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *Journal of the South African Veterinary Association*.
- [388] Woods, L.W. et al. 1994. Systemic Neosporosis in a California Black-Tailed Deer (*Odocoileus Hemionus Columbianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 6, 4 (1994), 508–510. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063879400600425>.
- [389] Wouda, W. et al. 2016. Bovine Fetal Neosporosis: A Comparison of Epizootic and Sporadic Abortion Cases and Different Age Classes with Regard to Lesion Severity and Immunohistochemical Identification of Organisms in Brain, Heart, and Liver: <http://dx.doi.org/10.1177/104063879700900212>. 9, 2 (Jun. 2016), 180–185. DOI:<https://doi.org/10.1177/104063879700900212>.
- [390] Wouda, W. et al. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *Journal of Parasitology*. 83, 3 (1997), 545–547. DOI:<https://doi.org/10.2307/3284431>.
- [391] YAMANE, I. et al. 2000. The Inhibitory Effect of Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha on Intracellular Multiplication of *Neospora caninum* in Primary Bovine Brain Cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62, 3 (Mar. 2000), 347–351. DOI:<https://doi.org/10.1292/JVMS.62.347>.
- [392] de Yaniz, M.G. et al. 2007. Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with *Neospora caninum* tachyzoites by conjunctival route. *Veterinary Parasitology*. 148, 3–4 (Sep. 2007), 213–218. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.030>.
- [393] Yao, L. et al. 2009. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology*. 136, 11 (Sep. 2009), 1251–1256. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0031182009990813>.
- [394] Yeşilbağ, K. et al. 2017. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [395] Young, N.J. et al. 2006. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference. *Journal of Virological Methods*. 138, 1–2 (Dec. 2006), 218–222. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.008>.
- [396] Zabal, O. et al. 2000. Contaminación del suero fetal bovino con virus de la diarrea viral bovina. *Revista Argentina de Microbiología*. 32, 1 (2000), 27–32.
- [397] Zanabria, V. et al. 2000. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 11, 2 (2000), 67–85.
- [398] Zhang, N. et al. 2011. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhoea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. *Virology Journal*. 8, 1 (Jul. 2011), 1–8. DOI:<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8->

374.

- [399] Zimmer, G.M. et al. 2002. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*. 89, 4 (2002), 255–265. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00203-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00203-1).
- [400] Zoth, S.C. et al. 2007. Recombinant E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus induces a solid humoral neutralizing immune response but fails to confer total protection in cattle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40, 6 (2007), 813–818. DOI:<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007000600010>.