

# Doctorado en Ciencia Animal

## Tesis

Caracterización de los agentes virales involucrados en el Complejo Respiratorio Bovino en sistemas intensivos bovinos del Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut, y evaluación de una vacuna formulada con cepas virales locales

Por: M.V. Romina María Apóstolo

Facultad de Ciencias Veterinarias  
U.N.C.P.B.A.



2020

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Caracterización de los agentes virales involucrados en el Complejo Respiratorio Bovino en sistemas intensivos bovinos del Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut, y evaluación de una vacuna formulada con cepas virales locales

Por: M.V. Romina María Apóstolo

Director: Dr. Carlos Alejandro Robles

Co-directora: Dra. Sonia Alejandra Romera

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A

Miembros del jurado:

Dra. Silvia M. Estein

Dr. Hector D. Tarabla

Dr. Fernando Fernández

*A mis abuelos*

*Azucena y Norberto*

## AGRADECIMIENTOS

A INTA que me brindó los medios para poder formarme a través del Programa de Becas Institucionales, del PATSU 1291205 y del PNSA 1115054.

A la EEA Esquel que me dio la libertad para elegir y el espacio para poder capacitarme.

A la EEA Bariloche y al Instituto de Virología que se convirtieron en mis segundos lugares de trabajo.

A Carlos Robles, que confió en mí y me guió con paciencia desde un principio en este proceso. Por los tantos y valorables consejos.

A Alejandra Romera, por su infinito apoyo y generosidad en brindarme el lugar y el tiempo para poder formarme.

A Sandra Pérez, por su constante acompañamiento y compromiso.

A Silvina Maidana, quien me enseñó las tareas de mesada con inconmensurable paciencia.

A todo el "Lab J" del Instituto de Virología por dejarme ser parte.

A los veterinarios: Adolfo Turcato, Victor Roberts y Javier Tana por permitirme trabajar con ellos.

A los productores: Edmundo Jones, Manuel Guitart, Ramón Romero, flia. Hopkins, Emir Jones, Arnold Evans, Eduardo Ellis, Rony Jones, Gabriel Gonzalez y Miguel Jones, quienes generosa y desinteresadamente me abrieron las puertas de sus chacras, me permitieron trabajar con sus animales y me brindaron su tiempo y su trabajo.

A Julio Mellado, Pablo Castillo, Jorge Tracaman, Miguel Raso y Martín Villa, compañeros de trabajo, por su ayuda en los trabajos en el Campo Experimental INTA Trevelin.

A Juan Pablo Martínez, que como compañero de trabajo siempre estuvo presente acercándose a los productores y acompañándome en cada salida al campo. Pero principalmente por ser mi compañero de vida, por estar siempre presente, por la paciencia y por el apoyo.

A Rosario, que llegó en medio de este proceso. Aún no sé si comprende el porqué de las distancias y de los tiempos de su mamá ausente. En contrapartida, si estoy segura que descubre el mundo de la mano de una familia fuerte y comprometida.

Gracias Juan. Gracias Rosarito. Gracias por ser mi familia.

## RESUMEN

En la presente tesis se trabajó en invernadas del Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut, con terneros de entre 6-8 meses de vida. Los objetivos fueron desarrollar conocimientos sobre la dinámica de circulación y características moleculares de Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV1), Virus de Parainfluenza Bovina 3 (BPI3V) y Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), estudiar el rol de los mismos en la ocurrencia de casos clínicos de Complejo Respiratorio Bovino (CRB) y evaluar estrategias sanitarias para el control de CRB. Se realizaron 4 actividades. La primera fue evaluar el rol de posibles factores de riesgo correspondientes al animal y a medidas de manejo en la ocurrencia de casos clínicos de CRB. La segunda actividad se centralizó en conocer la dinámica de circulación de BoHV1, BPI3V y BVDV a partir de estudios serológicos y virológicos. La tercera se relacionó con la detección de casos clínicos de CRB y la evaluación del rol de los virus durante los mismos. Por último, se evaluaron diferentes esquemas de vacunación en bovinos vacunados con inmunógenos formulados a partir de aislamientos locales. No se identificaron factores de riesgo asociados a la ocurrencia de casos de CRB en este estudio, aunque el clima húmedo y frío característico de la zona durante el invierno, podría actuar como un potencial factor de riesgo. Los tres virus circularon en las invernadas estudiadas, BoHV1 lo hizo asociado a un cuadro de queratoconjuntivitis, BPI3V lo hizo desde el momento de ingreso a las invernadas y BVDV asociado a la mezcla de animales de diferentes orígenes. En los casos de CRB no se pudo confirmar que los virus estudiados hayan estado involucrados. Como estrategia de control se concluye que serían necesarias 2 dosis de vacuna para alcanzar niveles satisfactorios de inmunidad, la primera dosis puede ser aplicada al momento del ingreso de los terneros a las invernadas y la segunda dosis entre 21-28 días posteriores al mismo.

## **ABSTRACT**

In the present thesis was worked in feedlot of the Valley October 16, province of Chubut, with calves between 6-8 months of life. The objectives were to develop knowledge about the dynamics of circulation and molecular characteristics of Bovine Herpes Virus type 1 (BoHV1), Bovine Parainfluenza 3 Virus (BPI3V) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), to study their role in the occurrence of clinical cases of Bovine Respiratory Complex (BRC) and evaluate sanitary strategies for the control of BRC. To achieve them, 4 activities were carried out. The first was to evaluate the role of possible risk factors for the animal and management measures in the occurrence of clinical cases of BRC. The second activity was focused on knowing the circulation dynamics of BoHV1, BPI3V and BVDV from serological and virological studies. The third was related to the detection of clinical cases of BRC and the evaluation of the role of the viruses during them. Finally, different vaccination schemes were evaluated in cattle vaccinated with immunogens formulated from local isolates. No risk factors associated with the occurrence of CRB cases were identified in this study, although the humid and cold climate characteristic of the area during winter could act as a potential risk factor. The three viruses circulated in the feedlot periods studied, BoHV1 was associated with cases of keratoconjunctivites, BPI3V did so from the time of arrival to feedlot and BVDV associated with the commingled of calves from multiple sources. In the cases of BRC, it could not be confirmed that the viruses studied were involved. As a control strategy it is concluded that 2 doses of vaccine would be necessary to reach satisfactory levels of immunity, the first dose can be applied at the time of the arrival of the calves to the feedlot and the second dose between 21-28 days later.

**Palabras clave:** Complejo Respiratorio Bovino; Invernadas; Chubut; Herpes Virus Bovino tipo 1; Virus Parainfluenza Bovina 3; Virus de la Diarrea Viral Bovina; Estrategias de control.

## ABREVIATURAS

**ABTS:** 2'-azino-bis (3-etilbenziazoline-6-ácido sulfónico)

**Ac:** Anticuerpos

**ADN:** Acido desoxirribonucleico; **ADNc:** Acido desoxirribonucleico copia

**ARN:** Ácido ribonucleico; **ARNasa:** enzima que degrada ARN de simple cadena; **ARNsin:** inhibidor de enzimas ribonucleasas

**BEI:** etilenimina binaria

**BoHV1:** Herpes Virus Bovino tipo 1; **BoHV5:** Herpes Virus Bovino tipo 5

**BPI3V:** Virus de Parainfluenza Bovina 3

**BVDV:** Virus de la Diarrea Viral Bovina

**BRSV:** Virus Sincitial Respiratorio Bovino

**°C:** Grados Celsius

**ccCRB:** caso clínico Complejo Respiratorio Bovino; **coCRB:** control sano CRB

**ccQ:** caso clínico Queratoconjuntivitis; **coQ:** control sano Queratoconjuntivitis

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CP:** citopática; **NCP:** no citopática

**CRB:** Complejo Respiratorio Bovino

**DICC<sub>50</sub>:** Dosis Infecciosa de 50% Cultivo Celular

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**DO:** Densidad Óptica; **DO<sup>X</sup>:** DO pocillos blanco; **DO<sup>P</sup>:** DO de sueros problemas

**E2:** Proteína E2 del virus de la Diarrea Viral Bovina

**EC:** Engorde a Corral

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**IC95%:** intervalo de confianza

**IgG:** Inmunoglobulina isotipo G

**INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

**KCl:** Cloruro de potasio

**kg/día:** kilogramos por día; **kgPV:** kilogramos de Peso Vivo

**km/hora:** kilómetros por hora

**LI:** Límite Inferior; **LS:** Límite Superior

**Log<sub>10</sub>:** logaritmo base 10

**M:** molar; **mM:** milimolar; **nM:** nanomolar

**MDBK:** Línea celular de riñón bovino Mardin Darby; **MDBKneg:** Línea celular sin infectar

**MEM:** Medio esencial mínimo; **MEM-E:** Medio esencial mínimo con sales de Eagle

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**mm:** milímetros

**M-MLV:** transcriptasa reversa

**mMol:** milimol; **pmol:** picomol

**ng:** nanogramos

**nm:** nanómetro

**NRC:** National Research Council

**OR:** odds ratio

**OPD:** o-fenilendiamina

**pb:** pares de bases

**PBS:** Buffer fosfato salino; **PBS-T:** Buffer con detergente monolaurato de polietilenglicol sorbitán al 10%

**PBS-T-OVA:** Buffer con detergente monolaurato de polietilenglicol sorbitán al 10% y ovoalbúmina

**PBS-T-3:** Buffer con detergente monolaurato de polietilenglicol sorbitán al 3%

**PCR:** Reacción en cadena polimerasa

**pH:** potencial hidrógeno

**PI:** Persistentemente infectados

**RC:** Recría a Corral

**REA:** Restricción enzimática

**RS:** Recría con Suplementación

**RT:** Transcripción reversa

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**TaqDNA:** enzima ADN polimerasa

**TBE:** buffer compuesto de Tris, Ácido Bórico y EDTA.

**TCI:** Temperatura Crítica Inferior

**T25:** botella de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>

**U:** Unidades; **UI:** Unidades Internacionales

**UV:** Ultravioleta

**VHH:** Anticuerpos de cadena pesada de llama

**µg:** microgramos; **µl:** microlitros

## INDICE

### INTRODUCCIÓN

1.Sistemas intensivos de producción de carne bovina.....	2
2.Complejo Respiratorio Bovino.....	2
2.1.- Causas.....	3
2.1.1.- Agentes Infecciosos.....	3
2.1.2.- Factores ambientales.....	3
2.1.3.- Factores del animal.....	4
2.2.- Diagnóstico, prevención y control.....	4
3.Sistemas de producción de carne bovina en el Valle 16 de Octubre.....	5
4.Antecedentes de CRB en Patagonia argentina.....	7
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL. MATERIALES Y MÉTODOS: GENERALIDADES</b>	
<b>Establecimientos.....</b>	<b>13</b>
<b>Animales.....</b>	<b>13</b>
<b>Muestras.....</b>	<b>15</b>
Sujeción de animales.....	15
Obtención de suero sanguíneo.....	15
Obtención de secreciones nasales y oculares.....	15
<b>Procesamiento y análisis de muestras.....</b>	<b>17</b>
Determinación de anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V.....	17
Sensibilización de placas.....	17
Desarrollo de la prueba.....	17
Interpretación de resultados.....	19
Titulación de sueros.....	19
Determinación de anticuerpos para BVDV.....	19
Sensibilización de placas.....	19
Desarrollo de la prueba.....	20
Interpretación de resultados.....	21
Aislamiento viral a partir de secreciones nasales y oculares.....	21
Líneas celulares utilizadas.....	21



Inoculación de muestras.....	21
Caracterización de aislamientos.....	22
BoHV1.....	23
BPI3V.....	24
Detección de genoma viral de BVDV en muestras de suero.....	24

## **CAPITULO 1: RELEVAMIENTO DE INVERNADAS**

### **A-Factores de riesgo: Variables correspondientes al animal y variables de manejo**

<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>34</b>

### **B-Dinámica de circulación del Herpes Virus Bovino 1, Virus Parainfluenza 3 y Virus de la Diarrea Viral Bovina**

<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>43</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>44</b>
<b>BoHV1.....</b>	<b>45</b>
Serología.....	45
Aislamiento BoHV1.....	47
<b>Discusión dinámica de circulación BoHV1.....</b>	<b>49</b>
<b>BPI3V.....</b>	<b>53</b>
Serología.....	53
Aislamiento BPI3V.....	56
<b>Discusión dinámica de circulación BPI3V.....</b>	<b>57</b>
<b>BVDV.....</b>	<b>60</b>
Serología.....	60
Aislamiento BVDV.....	63
<b>Discusión dinámica de circulación BVDV.....</b>	<b>63</b>
<b>Co-Infecciones.....</b>	<b>66</b>
<b>Discusión co-infecciones.....</b>	<b>67</b>

## **CAPITULO 2: CASOS CLÍNICOS**

<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>69</b>
Definición de caso clínico y de control sano de CRB.....	69
Definición de caso clínico y de control sano de queratoconjuntivitis.....	70

<b>Resultados.....</b>	70
Engorde a Corral 2.....	70
Recría con Suplementación 1.....	71
Recría a Corral 2.....	74
<b>Discusión.....</b>	76
<b><u>CAPITULO 3: Evaluación de esquemas de vacunación</u></b>	
<b>Vacunas evaluadas.....</b>	81
<b>Vacuna experimental.....</b>	81
Virus.....	81
Titulación viral.....	81
Inactivación.....	82
Formulación.....	82
<b>Vacuna comercial.....</b>	82
<b>Prueba de Potencia en Cobayos.....</b>	83
Materiales y métodos.....	83
Resultados Prueba de Potencia en Cobayos.....	84
Discusión Prueba de Potencia en Cobayos.....	86
<b>Evaluación de esquemas de vacunación en bovinos.....</b>	87
Materiales y métodos.....	87
Resultado evaluación de esquemas de vacunación en bovinos.....	89
BoHV1.....	89
BPI3V.....	91
Discusión evaluación de esquemas de vacunación en bovinos.....	92
<b>CONCLUSIONES.....</b>	96
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	98
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	109
<b>INDICE DE TABLA.....</b>	110
<b>ANEXOS.....</b>	113

# Introducción

## 1. Sistemas intensivos de producción de carne bovina

Los sistemas de producción de carne bovina intensivos como encierres a corral o feedlots y sistemas semi-intensivos con suplementación sobre pasturas, generan nuevas exigencias de manejo. Estos sistemas favorecen el movimiento de animales a través de diferentes regiones geográficas y con ello la posibilidad de transmisión de enfermedades entre regiones. A su vez, la mayor concentración de animales por unidad de superficie, genera un aumento en la tasa de contacto y aumenta la posibilidad de transmisión de agentes patógenos. A esto se suma un cambio cualitativo en la dieta ofrecida, lo que aumenta el riesgo de ocurrencia de enfermedades causadas por errores en la alimentación (Rossanigo *et al.*, 2009). El término invernada se emplea en Argentina, y en particular en este trabajo, como sinónimo de engorde de terneros a corral o sobre pasturas con o sin suplementación, hasta su terminación y posterior envío al mercado (Bavera, 2012).

A nivel país, la información sanitaria sistematizada sobre los sistemas de invernada es escasa. Costa *et al.* (2003), en un trabajo realizado por un período de un año en un feedlot en La Plata, encontraron que las bronconeumonías constituían la tercera causa de muerte. Según un trabajo elaborado por el Grupo de Sanidad Animal del INTA San Luis (Rossanigo *et al.*, 2010), entre las enfermedades más comunes en feedlots de tipo profesional y de tipo casero se encuentran las enfermedades del sistema respiratorio. Según un relevamiento de casos del Grupo de Sanidad Animal de INTA Balcarce (Späth y Becker, 2012), identifican a las neumonías como la segunda patología diagnosticada en la categoría de novillitos. De Yaniz *et al.* (2018), diagnosticaron un 45% de casos de neumonía en las necropsias realizadas en feedlots de los partidos de Tandil, Balcarce y Ayacucho de la provincia de Buenos Aires.

## 2. Complejo Respiratorio Bovino

Las enfermedades respiratorias que habitualmente se presentan en los terneros que se encuentran en sistemas intensivos (Rossanigo *et al.*, 2010) se denominan de manera general como Complejo Respiratorio Bovino (CRB), debido a la dificultad en diferenciar las diversas formas de presentación de estas afecciones en las condiciones a campo (Martin y Bohac, 1986).

A nivel mundial, el CRB se considera la principal condición que afecta los índices productivos y económicos en los sistemas intensivos bovinos (Smith, 1998). La muerte por CRB es la consecuencia más preocupante a nivel económico, sin embargo las mayores pérdidas se deben a los gastos en medicamentos y mano de obra necesarios en el tratamiento de los animales

enfermos (Galyean, 1999). A esto se suma la ineficiencia productiva debido a la mala conversión alimenticia, pérdida de peso e inferior calidad de la carcasa en la faena de los animales afectados (Odeón, 2008).

## **2.1.- Causas**

Las enfermedades respiratorias que se definen bajo el nombre de CRB, están determinadas por la participación en forma simultánea de distintos agentes infecciosos, factores de índole ambiental y factores propios del individuo (Odeón, 2008).

### **2.1.1.- Agentes infecciosos**

Entre los agentes involucrados en el CRB en Argentina, las bacterias frecuentemente aisladas son *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* (Odeón, 2008). Estas bacterias son comensales en la nasofaringe y tonsilas de los animales (Rowe *et al.*, 2001; Narayanan *et al.*, 2002). Agentes virales como el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV1), (actualmente alphaherpesvirus bovino-1, ICTV 2015), el virus de la parainfluenza 3 (BPI3V) (actualmente respirovirus bovino 3, ICTV 2018), el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) (actualmente pestivirus A y B, ICTV 2018) y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) (actualmente orthopneumovirus bovino, ICTV 2018) se han identificado como agentes involucrados en los casos de neumonía en el país (Bagnis *et al.*, 2006; Odeón, 2008). Estos virus actúan predisponiendo a infecciones bacterianas o en forma concurrente con las mismas (Taylor, 2010) al afectar el parénquima pulmonar (BRSV y BPI3V) y/o al alterar el sistema inmune (BVDV y BRSV) o las defensas locales (BoHV1) del sistema respiratorio (Babiuk *et al.*, 1988; Stillwell *et al.*, 2008).

### **2.1.2.- Factores ambientales**

El riesgo de ocurrencia de cuadros de CRB es mayor poco después del destete, el transporte y la llegada de los animales a los lugares de invernada (Taylor *et al.*, 2010). De hecho, la mayor cantidad de casos clínicos se observan durante los primeros 45 días post arribo a las invernadas (Smith, 1998; Thompson *et al.*, 2006; Babcock *et al.*, 2009). Entre los factores ya estudiados que generan riesgo, se encuentran la adquisición de animales en remates o ferias, la mezcla de animales de diferentes orígenes con condiciones sanitarias desconocidas, el manejo

previo al destete, el tipo de transporte y distancia recorrida, el cambio en la alimentación, el hacinamiento y los factores climáticos (Martin *et al.*, 1982; Ribble *et al.*, 1995; Cusack *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2008).

### **2.1.3.- Factores del animal**

El peso de los animales jóvenes es una variable que se relaciona con la edad de los mismos (Sanderson *et al.*, 2008). En este sentido, Galyean (1999) y Noström *et al.* (2000) plantean que animales que ingresan a los sistemas intensivos con menos de 200 kilogramos de peso vivo (kgPV) tiene mayor incidencia de CRB.

Los animales más jóvenes tienen menor capacidad de respuesta frente al contacto con potenciales patógenos debido a que poseen una nula o incipiente inmunidad adquirida (Sanderson *et al.*, 2008). A esto se suma que responden con una mayor intensidad de estrés frente a situaciones novedosas (Grandin *et al.*, 1998), lo que se traduce en un efecto negativo en el sistema inmune (Blecha, 1984). Este compromiso de su capacidad de defensa al ingreso a las invernadas, se suma al momento de mayor exposición y variedad de agentes infecciosos (Galyean, 1999), lo que resulta en un aumento en la susceptibilidad al CRB (Taylor, 2010).

### **2.2.- Diagnóstico, prevención y control**

El diagnóstico de CRB se realiza en base a la observación y detección de signos clínicos característicos (Duff y Galyean, 2007; Taylor 2010; McGuirk y Peek, 2014) como hiperpnea, anorexia, tos e hipertemia, y otros cuya presencia es variable como secreciones nasales, de tipo serosa o mucopurulenta, ruidos respiratorios, hipersalivación y/o conjuntivitis (Yates, 1982; Jubb *et al.*, 1990).

El diagnóstico temprano de los animales con CRB permite intervenir con estrategias de control adecuadas tendientes a minimizar las pérdidas (Fulton y Confer, 2012). Sin embargo, la limitación en este punto está en la subjetividad del método diagnóstico (Galyean 1999, Duff y Galyean, 2007), que conduce a la subdetección de casos (Gardner *et al.*, 1999) y por ende al inadecuado control de la enfermedad (Fulton y Confer, 2012).

El control de la enfermedad debe ir más allá de la identificación y tratamiento de los casos clínicos. Según Cusack *et al.* (2003), debido a la característica multifactorial del CRB, su control debe combinar medidas de manejo tendientes a evitar situaciones de estrés (Cusack *et al.*, 2003) con herramientas que les permitan a los animales responder al contacto con los agentes

patógenos (Peters *et al.*, 2004; Salt *et al.*, 2007).

Las vacunas comerciales contra CRB son inactivadas (SENASA, 2012) y contienen BoHV1, BPI3V, BVDV y BRSV y bacterias como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* (Parreño *et al.*, 2010a). Debido a la naturaleza de estas vacunas se necesitan dos dosis para generar un nivel de protección adecuado (Odeón, 2008). Según Engelken *et al.* (1997) la primera dosis debe administrarse tres semanas antes del destete y la segunda al momento del destete. En el país, es común utilizar una sola dosis de vacuna y cuando se utiliza doble dosis, la primera se aplica al ingreso de la invernada y se repite a las 3 o 4 semanas (Odeón, 2008), lo que deja una ventana sin protección en el momento en que los animales son más susceptibles al CRB (Poe *et al.*, 2013).

### **3.- Sistemas de producción de carne bovina en el Valle 16 de Octubre**

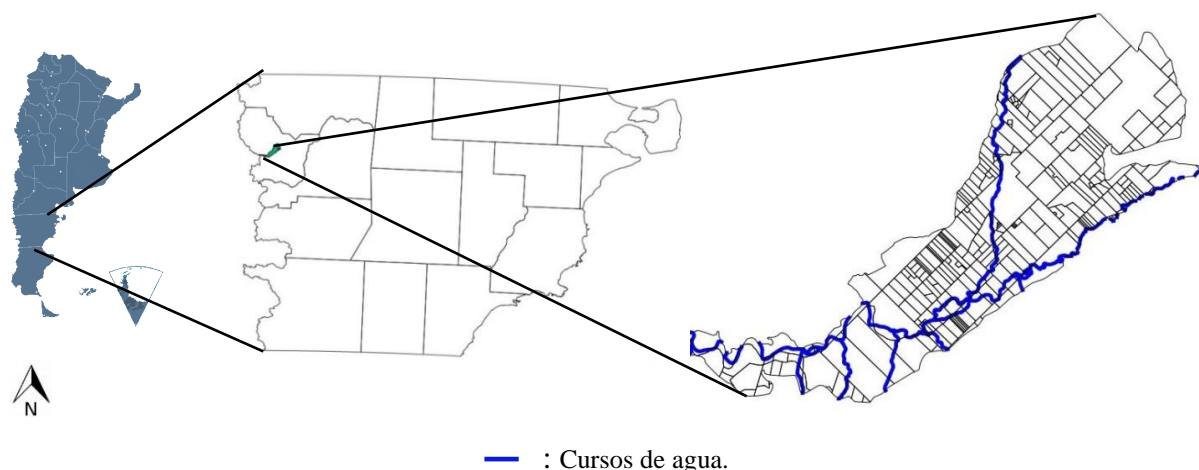
A nivel productivo en la Patagonia, la ganadería bovina se divide en dos sistemas en función de las condiciones agroecológicas de los ambientes. Así, en las zonas de bosques y esteparia, se desarrolla la etapa de cría extensiva mientras que en la zona de valles la actividad se ha orientado a la recría y terminación de los terneros provenientes de las áreas de cría (Guitart Fité, 2008, Plan Ganadero Prov. Chubut, 2017).

Dentro de esta última zona se sitúa el Valle 16 de Octubre, ubicado al noroeste de la provincia de Chubut (Figura 1). En este valle, las mayores superficies ocupadas corresponden a pasturas naturales e implantadas y producción de granos, principalmente cebada y avena. Toda la producción de forraje, ya sea bajo la forma de pastoreo directo o la confección de reservas como heno (fardos y rollos), silaje (silo bolsa) y granos, está dirigida la alimentación de bovinos de carne (Guitart *et al.*, 2004).

Este valle concentra la mayor cantidad de cabezas de ganado bovino de la provincia, con el 19% del total, lo que equivale a 45.500 animales (Antuña *et al.*, 2010; Rossanigo *et al.*, 2011; Guitart, comunicación personal) y, si bien no se cuenta con datos sobre la existencia de animales en invernadas, teniendo en cuenta a Guitart *et al.* (2004), Antuña *et al.* (2010) y datos del Sistema de Información Secundaria de INTA (SIS, 2015), se puede inferir que en el valle hay aproximadamente 18.000 animales en estos sistemas.

Los terneros se destetan en los meses de abril y mayo y son trasladados desde las zonas de cría hacia el valle. Ingresan a las invernadas con 7 a 8 meses de edad aproximadamente y con 160-250 kgPV. Las razas predominantes son Hereford, Aberdeen Angus y sus cruza (Guitart Fite, 2008).

**Figura 1.** Esquema catastral y fluvial del Valle 16 de Octubre en relación a la provincia de Chubut y a la República Argentina.



De acuerdo a Guitart *et al.* (2004), las internadas pueden clasificarse como (Tabla 1):

- recría a campo con o sin suplementación o a corral con aumentos diarios de peso vivo promedio de 500 gramos. Luego en noviembre los animales se alimentan con pasturas naturales para aprovechar el crecimiento compensatorio. Los animales recriados a campo con suplementación se terminan en febrero-marzo del año siguiente, mientras que los animales recriados a campo sin suplementación o a corral, se terminan en abril-mayo del año siguiente.

- engorde intensivo a corral o feedlot con aumentos diarios de peso vivo promedio de 1.000 gramos, con dietas a base de alimentos balanceados que finaliza en los meses de agosto-noviembre

Tanto en recría como en engorde a corral, los animales son terminados con un peso de 320-360 kgPV (Guitart Fite, 2008).

**Tabla 1:** Tipos de Internadas en el Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut.

Invernada	Tipo	Fecha ingreso	Fecha salida
	A campo	Abril - Mayo	Abril – Mayo año siguiente
<b>Recría</b>	A campo con suplementación	Abril- Mayo	Febrero – Marzo año siguiente
	A corral	Abril - Mayo	Abril – Mayo año siguiente
<b>Engorde</b>	A corral	Abril - Mayo	Agosto –Septiembre mismo año

El Valle 16 de Octubre presenta, como el resto de la región patagónica hacia el sur del Río Colorado, un estatus sanitario especial al ser reconocido como zona libre de Fiebre Aftosa sin vacunación (MAGyP, 2013). Esta calificación genera la imposibilidad de incorporar a la



región carne con hueso proveniente del norte de la barrera zoofitosanitaria, por lo que es necesario en la región el autoabastecimiento de carne bovina (INTA, 2015). Sin embargo este objetivo no se alcanza, generando un desfasaje entre oferta y demanda que se traduce en precios de comercialización un 25% superior al que reciben en el resto del país (INTA, 2018).

#### **4.- Antecedentes de CRB en Patagonia argentina**

En la Patagonia argentina, estudios previos demuestran evidencia serológica en bovinos a la exposición a BoHV1, BPI3V y BVDV. En la comunidad Millaín Currical, ubicada en cercanías de la localidad de Loncopué, en la provincia de Neuquén, sobre 350 animales de una población total de 817 bovinos, se registró un 54% de serología positiva para BoHV1, 74% para BVDV y 99% para BPI3V aun cuando no se pudieron comprobar casos clínicos de enfermedad relacionados con estos virus (Robles, 2008). Durante el año 2011, un estudio serológico en vacas de 83 campos de cría de los departamentos del noroeste de la provincia de Chubut demostró seroprevalencias individuales de 52,3% para BoHV1 y 76,6% para BVDV. A nivel rodeo se detectó una seroprevalencia de 50% para BoHV1 y 96,3% para BVDV (Pérez Aguirreburualde, 2014a).

Durante el año 2013 se llevaron a cabo muestreos en establecimientos de invernada en el Valle 16 de Octubre. En ninguno se utilizaban vacunas que tuvieran antígenos de los virus involucrados en el CRB. Los resultados serológicos de las muestras tomadas al ingreso a las invernadas mostraron en promedio 62,1% de animales positivos para BPI3V (Apóstolo *et al*, 2016) y un 14,8% para BoHV1 (Apóstolo, dato inédito). Además, se aislaron 4 cepas de BPI3V de animales sin síntomas respiratorios (Apóstolo *et al.*, 2016) y 10 cepas de BoHV1 de animales con y sin síntomas (Apóstolo *et al*, 2017).

Teniendo en cuenta que el CRB es el principal cuadro clínico que afecta los índices productivos y económicos en los sistemas intensivos bovinos a nivel internacional, que su presentación es variable en distintas regiones del país, que la zona de estudio propuesta concentra la mayor cantidad de ganado bovino de la provincia y que hay evidencias de exposición y circulación de BoHV1, BPI3V y BVDV, resulta necesario determinar la presencia y dinámica de las infecciones por estos virus y las implicancias que tendrían las mismas en las invernadas. Además, es importante caracterizar molecularmente los aislamientos virales locales para poder formular vacunas efectivas y establecer los esquemas de vacunación que resultarían estratégicos para el control del CRB en la región en estudio.

# Hipótesis

En base a los antecedentes presentados, es posible plantear las siguientes Hipótesis:

a) Los virus involucrados en el CRB que circulan en el Valle 16 de Octubre, son molecularmente similares a los que circulan en otras regiones del país.

b) La aparición de casos clínicos de CRB en los sistemas intensivos bovinos del Valle 16 de Octubre está relacionada principalmente con factores correspondientes al animal y a las medidas de manejo propias de la zona.

c) El uso de vacunas inactivadas formuladas con aislamientos locales como estrategia para controlar la circulación y prevenir la infección debe considerar la administración de dos dosis, aplicadas la primera previo al destete y la segunda al momento del destete.

# Objetivos

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar conocimientos sobre la dinámica de circulación y características moleculares de los virus involucrados en el Complejo Respiratorio Bovino en invernadas del Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut, y evaluar estrategias sanitarias para su control.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a- Evaluar el rol de factores correspondientes al animal y de medidas de manejo en la ocurrencia de casos clínicos de Complejo Respiratorio Bovino
- b- Conocer la dinámica de circulación del Herpes Virus Bovino 1, Virus Parainfluenza 3 Bovino y Virus de la Diarrea Viral Bovina
- c- Caracterizar virológicamente y molecularmente los aislamientos obtenidos de secreciones y/o tejidos de animales con y sin síntomas de Complejo Respiratorio Bovino
- d- Evaluar esquemas de vacunación en bovinos vacunados con inmunógenos formulados a partir de aislamientos locales.

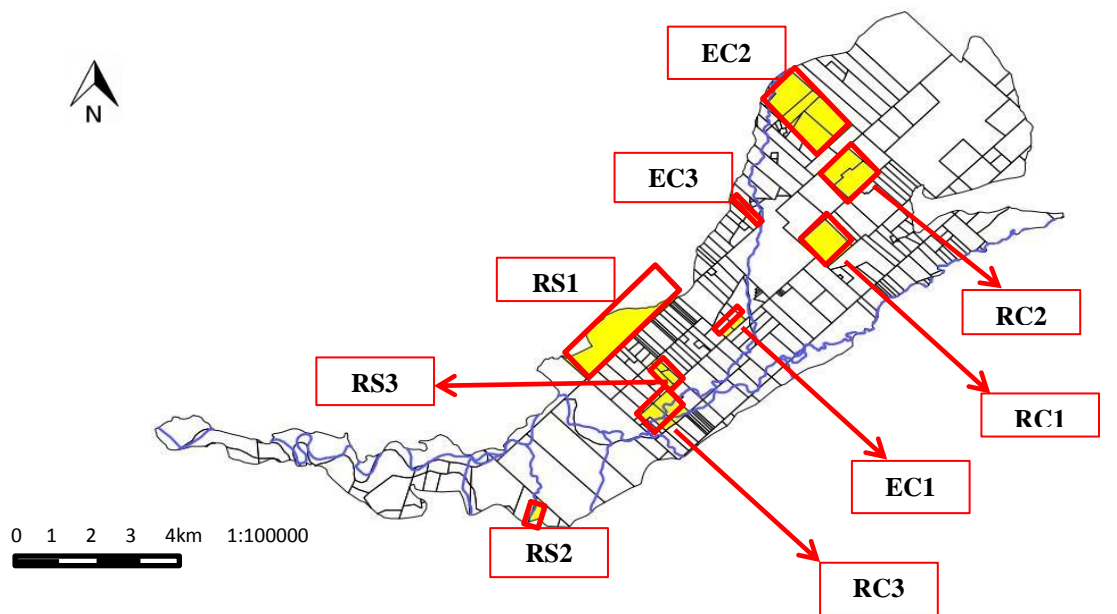
# **Diseño Experimental**

## **Materiales y Métodos: Generalidades**

## ESTABLECIMIENTOS

El relevamiento y el estudio de casos clínicos de CRB se llevó a cabo en 9 invernadas del Valle 16 de Octubre (Figura 2 y Tabla 2).

**Figura 2:** Ubicación de los establecimientos relevados dentro del Valle 16 de Octubre. (Elaboración propia: Quantum Gis 1.8.).



EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; —: Cursos de agua

## ANIMALES

Este estudio se realizó con terneros de destete durante las temporadas de ingreso a las invernadas (abril-mayo) en los años 2014 y 2015 (Tabla 3).

**Tabla 2:** Establecimientos relevados: nombre, código de identificación, tipo de invernada, superficie total expresada en hectáreas y coordenadas geográficas.

Establecimiento	Código	Tipo de invernada	Superficie (ha)	Coordenadas geográficas
El Principio	EC1	Engorde a corral	28	43° 7' 20,6" S 71° 29' 1,3" O
Los Pinos	EC2	Engorde a corral	400	43° 1' 43,4" S 71° 26' 29,1" O
Peny Bryn	EC3	Engorde a corral	80	43° 4' 43,6" S 71° 28' 22,9" O
Campo Experimental INTA	RS1	Recría con suplementación	3042	43° 6' 56,7" S 71° 32' 3,2" O
Tird Taid	RS2	Recría con suplementación	210	43° 12' 19,9" S 71° 34' 30,4" O
El Molino	RS3	Recría con suplementación	75	43° 8' 0,9" S 71° 31' 48,6" O
El Malacara	RC1	Recría a corral	262	43° 5' 30,8" S 71° 27' 0,5" O
El Horizonte	RC2	Recría a corral	300	43° 4' 4,1" S 71° 25' 32,7" O
La Elena	RC3	Recría a corral	175	43° 8' 15,9" S 71° 29' 28,3" O

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral

**Tabla 3:** Cantidad, raza y peso promedio de los animales al ingreso en los establecimientos de invernada relevados.

Establecimiento	Cantidad de animales	Raza	Peso promedio al ingreso (kg)
EC1	40	Hereford	173
EC2	78	Hereford y cruza Aberdeen Angus y Charolais	200
EC3	27	Hereford	130
RS1	71	Hereford, Aberdeen Angus y su cruza	153
RS2	48	Hereford, Aberdeen Angus y su cruza	140
RS3	80	Hereford	180
RC1	50	Hereford, Aberdeen Angus y su cruza	140
RC2	120	Aberdeen Angus	180
RC3	78	Hereford	190
<b>TOTAL</b>	<b>592</b>		<b>165</b>

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; kg: kilogramos.



## MUESTRAS

- **Sujeción de animales**

La inmovilización de los terneros se realizó en forma mecánica mediante el uso de cepo (de madera o metal). A posterior se sujetó la cabeza del animal hacia un costado, manualmente o con el uso de mocheta. La maniobra por animal duró aproximadamente 1 minuto para la obtención de muestras de sangre y aproximadamente 2 minutos cuando se tomaron muestras de secreciones.

- **Obtención de suero sanguíneo**

El suero se obtuvo a partir de 8 ml de sangre extraídos de la vena yugular utilizando sistema Vacutainer<sup>®</sup> con tubos sin aditivo de 10 ml (16 x 100 mm) y agujas 20Gx1,5” (Figura 3). Al día siguiente de la extracción, la sangre se centrifugó por 10 minutos a 1200 revoluciones por minuto y luego se separó el suero en microtubos tipo Eppendorff (Deltalab<sup>®</sup>) de 1,5 ml, los que fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento (Zbrun *et al.*, 2011).

**Figura 3:** Toma de muestra de sangre para obtención de suero sanguíneo.



- **Obtención de secreciones nasales y oculares**

Las secreciones de la mucosa nasal y de la conjuntiva ocular fueron tomadas con hisopos de dacrón estériles (Deltalab<sup>®</sup>) (Zbrun *et al.*, 2011) de 15 cm de largo. Para secreciones nasales se introdujo el hisopo en una de las narinas (generalmente la izquierda atendiendo a la sujeción de la cabeza del animal) y se lo friccionó de manera enérgica por aproximadamente 10 segundos

(Figura 4). Para las secreciones oculares se frotó el hisopo en la conjuntiva del canto medial y el tercer párpado del ojo izquierdo (Figura 5).

Cada hisopo fue colocado en criotubos de 1,8 o 2 ml (NEST<sup>®</sup>) conteniendo 0,5 ml de medio de cultivo mínimo esencial con sales de Eagle (MEM-E) (Gibco<sup>®</sup>), suplementado con penicilina 5000 UI/ml, estreptomicina 2500 µg/ml y anfotericina B 10 µg/ml. Una vez introducido el hisopo en el criotubo se cortó el remanente del hisopo. Por último, las muestras se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento (Romera *et al.*, 2001).

**Figura 4:** Toma de muestra de secreciones nasales.



**Figura 5:** Toma de muestra de secreciones oculares.



## PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

### • Determinación de anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V

La determinación de anticuerpos totales contra BoHV1 y BPI3V en muestras de suero se realizó mediante dos tests de ELISA indirecto (Bratanich *et al.*, 1990; Romera *et al.*, 2001; Maidana *et al.*, 2013).

En ambos casos se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (Thermo Scientific - NUNC<sup>®</sup>, Modelo IMMULON 1B).

#### - Sensibilización de las placas

Para BoHV1 se sensibilizaron placas con antígeno purificado preparado a partir de cultivos de células MDBK infectadas con BoHV1 (MDBK+BoHV1) (Romera *et al.*, 2001, Parreño *et al.*, 2010a). Como control de antígeno se utilizaron cultivos de células MDBK sin infectar (MDBKneg). Ambos se diluyeron en una relación 1:400 en buffer carbonato pH 9,6 (Anexo I) y se colocaron 50 µl por pocillo de cada solución de manera alternada en las columnas de las placas (Anexo I).

Para BPI3V se sensibilizaron placas con antígeno purificado preparado a partir de cultivos de células MDBK infectadas con BPI3V (MDBK+BPI3V) (Maidana *et al.*, 2013). Como control de antígeno se utilizaron cultivos de células MDBK sin infectar (MDBKneg). Ambos se diluyeron en una relación 1:200 en buffer carbonato pH 9,6 (Anexo I) y se colocaron 50 µl por pocillo de cada solución de manera alternada en las columnas de las placas (Anexo I).

En ambos casos las placas se incubaron selladas con tapas de poliestireno durante 12 horas a 4°C para lograr el pegado del antígeno. Cumplida la incubación, se descartaron los inóculos invirtiendo las placas y aplicando movimientos enérgicos hacia abajo. Luego se lavaron manualmente tres veces con buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 0,05% de monolaurato de polietilenglicol sorbitán (Tween<sup>®</sup> 20, Promega) (PBS-T) y se secaron aplicando golpes suaves a las mismas en posición invertida sobre un papel absorbente. Para su conservación se sellaron con tapa de poliestireno y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

#### - Desarrollo de la prueba

Las placas sensibilizadas se descongelaron a temperatura ambiente. A fin de evitar la unión inespecífica de biomoléculas a la superficie de los pocillos que no fue ocupada por MDBK+BoHV1 o BPI3V y MDBKneg, se procedió a bloquear los sitios de enlace desocupados

con 50 µl por pocillo de ovoalbúmina diluida al 5% en PBS-T (PBS-T OVA) durante 1 hora a 37°C, en agitación constante y con las placas selladas con tapas de poliestireno.

Cumplida la incubación, se descartó la solución de bloqueo invirtiendo las placas y aplicando movimientos enérgicos hacia abajo. Luego las placas se secaron.

Los sueros problemas, previamente descongelados a temperatura ambiente, se diluyeron en PBS-T OVA en una relación 1:40 y se sembraron 50 µl de cada muestra diluida en un pocillo con células infectadas (MDBK + BoHV1 o BPI3V) y 50 µl en otro pocillo con células sin infectar (MDBKneg). Se utilizaron sueros positivos y negativos como controles en cada placa (Anexo I). Se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación constante y con las placas selladas con tapas de poliestireno.

Luego de la incubación, se descartaron las soluciones de sueros problemas, se lavaron las placas manualmente completando la totalidad del volumen de los pocillos con PBS-T y descartando la solución con movimientos enérgicos hacia abajo. Este procedimiento se repitió tres veces. Luego las placas se secaron.

Se colocaron 50 µl por pocillo de solución de anticuerpo policlonal de cabra, purificado por afinidad a IgG bovina (H+L) marcado con peroxidasa de rábano picante (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL) diluido en una relación 1:2000 en PBS-T OVA. Se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación constante y con las placas selladas con tapas de poliestireno.

Luego de la incubación, se descartó la solución de conjugado, se lavaron las placas tres veces con PBS-T y se secaron

El revelado de las placas se hizo de manera diferente para cada virus:

a-Para BoHV1 cada placa se reveló con 100 µl por pocillo de una solución elaborada con 300 µl de 2'-azino-bis (3-etilbenziazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS) (SIGMA, Lab. Roche) como cromógeno (Anexo I), 60 µl de peróxido de hidrógeno al 10% como sustrato (Anexo I) y 12 ml de buffer citrato pH 5 (Anexo I). La reacción se desarrolló a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 20 minutos. Pasado ese tiempo se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan) a 405 nm.

b-Para BPI3V cada placa se reveló con 50 µl por pocillo de una solución elaborada con 600 µl de o-fenilendiamina (OPD) (SIGMA, Lab. Roche) como cromógeno (Anexo I), 30 µl de peróxido de hidrógeno al 10% como sustrato (Anexo I) y 5,4 ml de agua destilada. La reacción se frenó con 50 µl de ácido sulfúrico por pocillo (Anexo I) en el momento en que el control positivo se observó color amarillo. La lectura de la DO se realizó en lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan) a 490 nm.

### - Interpretación de resultados

El punto de corte para los resultados del test de ELISA indirecto se determinó, para ambos virus, como el 40% del valor de DO corregida (MDBK+BoHV1 o BPI3V - MDBKneg) del control positivo (rango 0,6-1,2). A partir de ese punto, los sueros problemas con una DO corregida igual o superior se consideraron positivos, y aquellos con una DO corregida menor se consideraron negativos (Del Médico Zajac *et al.*, 2006; Maidana *et al.*, 2013). A estos últimos se les asignó valor 0 (cero) para su posterior análisis estadístico.

### - Titulación de sueros positivos

A los sueros problema que resultaron positivos, se los tituló siguiendo de manera exacta los procedimientos antes descriptos a excepción del punto de siembra. En este caso, los sueros se diluyeron en base 40 hasta una dilución 1:2640 y se sembraron 50 µl de cada muestra diluida, en un pocillo con células infectadas (MDBK + BoHV1 o BPI3V) y 50 µl en otro pocillo con células sin infectar (MDBKneg) (Anexo I). Los títulos de anticuerpos se expresaron para BoHV1 y BPI3V como  $\text{Log}_{10}$  del valor recíproco de la máxima dilución de cada suero que presentó un valor de DO corregida igual o mayor al 40% del valor de DO corregida para el control positivo (Del Médico Zajac *et al.*, 2006, Maidana *et al.*, 2013). Se consideró como indicador de seroconversión el pasaje de la condición de seronegativo a positivo y/o un incremento de 2 ó más veces el título de anticuerpos totales.

### • Determinación de anticuerpos totales contra BVDV

La determinación de anticuerpos totales contra BVDV en muestras de suero se realizó mediante un test de ELISA de competición.

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Scientific - NUNC<sup>®</sup>, superficie MaxiSorp)

### - Sensibilización de las placas

Se sensibilizaron placas con nanoanticuerpos bivalentes de llama VHH monoespecíficos anti proteína E2 de BVDV (Zamit, 2010; Perez Aguirreburualde, 2014a). Se diluyeron en una relación 1:240 en buffer carbonato pH 9,6 (Anexo I) y se colocaron 50 µl por pocillo de la solución. Las placas se incubaron selladas con tapas de poliestireno durante 12 horas a 4°C para lograr el pegado de los anticuerpos. Cumplida la incubación, se retiraron los inóculos invirtiendo las placas y aplicando movimientos enérgicos hacia abajo. Luego se lavaron las placas

manualmente completando la totalidad del volumen de los pocillos con PBS-T al 3% (PBS-T-3) y descartando la solución con movimientos enérgicos hacia abajo. Este procedimiento se repitió tres veces. Luego las placas se secaron y se utilizaron inmediatamente.

#### **- Desarrollo de la prueba**

A fin de evitar la unión inespecífica de biomoléculas a la superficie de los pocillos que no fue ocupada por los anticuerpos bivalentes VHH anti proteína E2 de BVDV, se procedió a bloquear los sitios de enlace desocupados con leche descremada diluida al 1% en PBS-T-3 agregando 50 µl por pocillo de esta solución. Se incubó por 1 hora a 37°C con las placas selladas con tapa de poliestireno.

Cumplida la incubación se descartó la solución de bloqueo. Las placas se lavaron tres veces manualmente con PBS-T-3 y se secaron.

Se diluyó la proteína E2 (Pécora *et al.*, 2015) de BVDV en PBS-T-3 en una dilución 1:32. Se colocaron 50 µl de esta solución por pocillo. Se incubó por 1 hora a 37°C con las placas selladas con tapa de poliestireno.

Cumplida la incubación se descartó la solución de la proteína E2. Las placas se lavaron tres veces manualmente con PBS-T-3 y se secaron.

Se colocaron 50 µl por pocillo de una solución formulada con los sueros problemas, que previamente se descongelaron a temperatura ambiente, y leche descremada al 1% en PBS-T-3 de manera individual en una dilución 1:4. Se utilizaron tres sueros controles positivos y un suero control negativo que se diluyeron inicialmente en una relación 1:4 y hasta alcanzar una dilución 1:256. Se dejaron 6 pocillos por placa sin agregado de sueros problema, como blancos (Anexo I). Se incubó por 1 hora a 37°C con las placas selladas con tapa de poliestireno.

Cumplida la incubación se descartaron los sueros problemas. Las placas se lavaron tres veces manualmente con PBS-T-3 y se secaron.

Se colocaron 50 µl por pocillo de solución formulada con suero de conejo hiperinmune anti E2 (competidor) purificada (Perez Aguirreburualde, 2014a) y leche descremada al 1% en PBS-T-3 en una dilución 1:4000. Se incubó por 1 hora a 37°C con las placas selladas con tapa de poliestireno.

Cumplida la incubación se descartó la solución de suero de conejo hiperinmune anti E2. Las placas se lavaron tres veces manualmente con PBS-T-3 y se secaron.

Se colocaron 50 µl por pocillo de solución formulada con anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad a IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (Invitrogen®)

y leche descremada al 1% en PBS-T-3 en una dilución 1:3000. Se incubó por 1 hora a 37°C con las placas selladas con tapa de poliestireno.

Cumplida la incubación se descartó la solución de conjugado. Las placas se lavaron tres veces manualmente con PBS-T-3 y se secaron.

Las placas se revelaron con 50 µl por pocillo de solución elaborada con 150 µl de ABTS como cromógeno (Anexo I), 30 µl de peróxido de hidrógeno al 10% como sustrato (Anexo I) y 6 ml de buffer citrato pH 5 (Anexo I). La reacción se desarrolló a temperatura ambiente y protegida de la luz hasta que en las diluciones del control negativo se observó una DO entre 0,500-0,800 medida con lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan) con un filtro de 405 nm. En ese momento la reacción se frenó con dodecilsulfato sódico (SDS) al 5%. La lectura de la DO del resto de los pocillos se hizo en el mismo lector de ELISA y con un filtro de 405 nm.

#### **- Interpretación de resultados**

Se promediaron las DO de los 6 pocillos blancos ( $DO^X$ ). Estos pocillos expresaban el máximo de anticuerpo anti E2 de conejo adherido a la proteína y por ende la ausencia de anticuerpos anti E2 de los sueros problemas de bovinos. Ese valor se utilizó para calcular, para cada DO de los sueros problemas ( $DO^P$ ), el porcentaje de anticuerpo anti E2 de conejo que fue desplazado por la presencia de anticuerpos anti E2 de bovino ( $100 - (DO^P \times 100 / DO^X)$ ). El punto de corte se estableció en el 15% de presencia de anticuerpos bovinos, por debajo de ese porcentaje de desplazamiento, los sueros se consideraron negativos. Se consideró seroconversión al aumento en un 20% como mínimo en la cantidad de anticuerpos entre tomas de muestras.

#### **• Aislamiento viral en de secreciones nasales y oculares**

##### **- Líneas celulares utilizadas**

Se utilizaron células MDBK en medio de cultivo mínimo esencial (MEM) (Gibco®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) (Romera *et al.*, 2014), L-Glutamina (10µl/ml), penicilina-estreptomicina (10µl/ml) y anfotericina B (20µl/ml). Esta línea celular fue provista por la sección de Cultivos de Tejidos del Instituto de Virología, INTA Castelar.

##### **- Inoculación de las muestras**

Para su análisis, las muestras de secreciones de la mucosa nasal y de la conjuntiva conservadas en nitrógeno líquido, se descongelaron a temperatura ambiente y se

homogeneizaron con vortex. Luego se inocularon de manera individual 50 µl de sobrenadante de las muestras sobre monocapas de células MDBK en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Jetbiofil®). Como controles se dejaron 2 pocillos por placa con células sin inocular. Se incubaron en atmósfera húmeda y con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante 1 hora y 30 minutos a 37°C, para permitir la adsorción viral a las células en caso de ser una muestra positiva.

Posterior a la incubación, se eliminaron los inóculos invirtiendo la placa de cultivo y realizando movimientos suaves hacia abajo con la misma. Luego se colocaron 100 µl por pocillo de medio MEM-E suplementado con 2% de SFB y la placa se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las monocapas se observaron diariamente durante 72 horas para determinar la aparición de efecto citopático (Romera *et al.*, 2001). Las monocapas que no presentaron efecto citopático fueron sometidas a tres pasajes ciegos sucesivos. Esto se realizó con el fin de aumentar la sensibilidad de la prueba mediante el incremento de la concentración viral en caso de que la muestra se presentara como falsa negativa. Las monocapas que pasados los tres pasajes no presentaron efecto citopático se consideraron negativas.

#### **- Caracterización de aislamientos**

Las monocapas que presentaron efecto citopático en cualquiera de los pasajes, se homogeneizaron de manera manual con el uso de micropipetas y se inocularon individualmente sobre monocapas de células MDBK en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25) (Jetbiofil®). Al inóculo se le adicionaron 500 µl de medio MEM-E suplementado con 2% de SFB y se incubaron en atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora y 30 minutos a 37°C, para permitir la adsorción del virus a la célula. Luego se agregaron 5 ml de medio MEM-E suplementado con 2% de SFB a cada T25 y se incubaron hasta observar la extensión del efecto citopático a toda la monocapa. Las botellas de cultivo se congelaron a -80°C. Luego se sometieron a tres procesos de descongelado a temperatura ambiente y congelado a -80°C a fin de lisar las células y desprenderlas de la superficie interna de la botella de cultivo. Los sobrenadantes se alicuotaron en volúmenes de 1 ml en microtubos tipo Eppendorff de 1,5 ml (Deltalab®) estériles, se rotularon y se conservaron a -80°C.

A partir de los sobrenadantes de las muestras positivas resultantes del 4° pasaje se realizaron pruebas específicas para la identificación de cada virus mediante pruebas moleculares



## BoHV1

Se extrajo ADN viral mediante el uso de un kit comercial de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (High Pure PCR template preparation kit, Roche). Luego se realizó una PCR multiplex diferencial para BoHV1 y BoHV5 (Herpesvirus bovino tipo 5) para confirmar y tipificar los aislamientos (Clauss *et al.*, 2005).

Se utilizaron cebadores para la detección e identificación de un segmento de 354 pb de del gen de la glicoproteína C de BoHV1 y de 159 pb de BoHV5. Los cebadores utilizados fueron: B1 específico para BoHV1 (5-CAACCGAGACGGAAAGCTCC-3\_nt 185–204); B5 específico para BoHV5 (5-CGGACGAGACGCCCTTGG-3\_nt 322-339) y un cebador consenso para ambos virus Bcon (5-AGTGCACGTACAGCGGCTCG-3\_nt 519-538 para BoHV1 y nt 461-480 BoHV5). La PCR multiplex fue preparada en un volumen de reacción final de 12,5 µl conteniendo 50 ng de ADN total extraído; 0,4 pmol de cada cebador; 1,5 mMol dNTPs (Invitrogen TM Life Technologies, USA); 2,5 unidades (U) de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen TM Life Technologies, USA); 1X buffer de PCR (20 mM Tris–HCl pH 8,4, 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y agua ultra pura hasta llegar al volumen final. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Biometra TRIO – Thermoblock) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 96 °C seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 96 °C; 1 minuto a 58 °C; 1 minuto a 72 °C y un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C. Finalmente los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en buffer TBE pH 8,4 (Anexo I) y visualizado bajo luz UV (Maidana *et al.*, 2018).

La determinación de subtipos de BoHV1 se realizó a partir de una PCR multiplex con restricción enzimática (REA) (Maidana *et al.*, 2016). Se utilizaron dos pares de cebadores para amplificar 2 fragmentos de ADN, uno de 700 pb (US3) y el otro de 550 pb (UL39). Los cebadores utilizados fueron: US3F (5-TACAAATCGGCGGCCAAA-3 nt 115134) y US3R (5-TTGTTGACGGCCAAGTATAA-3\_nt 115834); UL39F (5-TCGTCGAAGAGCGTCCACA CA-3\_nt 24783) y UL39R (5-ACCGCGCTGTACCGGCAGCT-3\_nt 25275). Los productos de la PCR fueron digeridos con la enzima *Hind*III y sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa de 2% y finalmente se visualizaron las diferentes combinaciones de clivado bajo luz UV. El subtipo 1.1 se identificó por la ausencia de clivaje. El subtipo 1.2a se detectó por el clivaje del fragmento de 700 pb en un fragmento de 440 pb y otro de 260 pb. El subtipo 1.2b se detectó porque además del fragmento de 700 pb, se clivó el fragmento de 550pb en uno de 300 pb y otro de 250 pb.

### **BPI3V**

Se extrajo ARN viral mediante el uso de un kit comercial de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (TIANamp Virus DNA/RNA, Tiangen Biotech).

La transcripción reversa (RT) se realizó a partir de 7 µl de ARN y 0,3 µg de cebador específico (Mfw) (0,5µg/µl). Luego se agregó buffer 5X de la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega), dNTPs (5mM), 40 U de ARNsin (inhibidor de ribonucleasas) y 200 U de M-MLV. El volumen final de la reacción se llevó a 25 µl con agua libre de ARNasa. La condición térmica fue de 60 minutos a 42°C seguido por 5 minutos a 90°C.

A partir del ADNc obtenido, se amplificó por PCR un fragmento interno del gen codificante para la enzima gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (gen *gapdh*), gen celular de expresión constitutiva (control de extracción de ARN y RT). Seguidamente los ARNs positivos para el gen *gapdh* fueron estudiados en busca de genoma viral de BPIV3. Para ello se utilizó un par de cebadores para la detección e identificación de un segmento de 328pb del gen de la matriz (M) de BPI3V, MF (5-AGTGATCTAGATGATGATCCA-3\_nt 3960) y MR (5-GTTATTGATCCAATTGCTGT-3\_nt 4288). La PCR se preparó en un volumen de reacción final de 12,5 µl conteniendo 5 ng de ADNc, 100 ng de cebadores, buffer 5X para la reacción de la enzima ADN polimerasa (Green GoTaq, Promega), mezcla de dNTPs 200 µM (cada uno) y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen™ Life Technologies, USA), MgCl<sub>2</sub> y agua libre de ARNasa hasta alcanzar volumen final. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Biometra TRIO – Thermoblock).

Los productos de PCR se purificaron usando un kit comercial (Qiaquick PCR purification (QIAGEN)).

La secuenciación se hizo en ambos sentidos con BigDye Terminator v3.0 kit (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) y se analizaron con ABI Prism 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) (Maidana *et al.*, 2012).

- **Detección de genoma viral de BVDV en muestras de suero**

Se extrajo ARN viral a partir de 250 µl de suero mediante el uso de un kit comercial de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (TIANamp Virus DNA/RNA, Tiangen Biotech).

La transcripción reversa (RT) se realizó a partir de 1µg de ARN total y 0,5 µg de cebador inverso 326 5'UTR, cebador universal de gen específico para *Pestivirus* (Vilcek *et al.*, 1994) como preparación para la amplificación por PCR de la región 5' UTR ó 0,5µg de cebadores hexanucleotídicos al azar (Biodynamics SRL) como preparación para la amplificación por PCR

de la región E2. La mezcla de ARN y cebadores se calentó a 70°C durante 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo.

Luego se agregó 5µl del buffer 5X (Tris-HCl 50mM, KCl 75mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM y DTT 10mM (Promega)), 1µl de mezcla de dNTPs 25mM (Promega), 20 U de ARNsin (inhibidor de ribonucleasa) (Ambion/Promega), 200 U de la enzima M-MLV (Promega) y agua libre de ARNasa hasta alcanzar el volumen final de 25 µl. La condición térmica fue de 60 minutos a 42°C seguido por 5 minutos a 95°C.

A partir del ADNc obtenido, se amplificó por PCR un fragmento de 288 pb de la región de 5'UTR utilizando los los cebadores universales *Pestivirus* 5'UTR-específicos 324 y 326 (Vilcek *et al.*, 1994). Para la amplificación del fragmento de 920 pb de la región E2 se utilizaron 3 cebadores: F1 (5-AGCACTGAGGGGACAATAAT-3\_nt\_2437), R1 (5-GCCTATCATGACTATCTCTTCAGT-3 nt\_3593) y R2 (5-TTCAGTATTCCTCCAGCACC-3 nt\_3578) (Pécora *et al.*, 2014). La PCR se preparó en un volumen de reacción final de 25 µl conteniendo 60 nM de cada cebador; 5µl del buffer 5X para la reacción de la enzima ADN polimerasa (GoTaq, Promega); 1µl de mezcla de dNTP 25mM, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen TM Life Technologies, USA), 4,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM y agua libre de ARNasa hasta alcanzar el volumen final. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Biometra TRIO – Thermoblock) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C; 30 segundos a 51°C y luego la elongación 1 minuto a 72°C. El ciclo final de extensión se realizó durante 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando un kit comercial (Asistente para SV Gel y PCR Clean-Up System, Promega) (Perez Aguirreburualde, 2014a).

# **Capítulo 1:**

## **Relevamiento de Invernadas**

Materiales y Métodos  
Resultados  
Discusión

Entre los meses de abril y mayo de los años 2014 y 2015 se realizó un muestreo por conveniencia en establecimientos de invernada del Valle 16 de Octubre, en función a la no utilización de vacunas que tuvieran antígenos de los virus involucrados en el CRB. Además se tuvo en cuenta la presencia de corrales, manga y cepo que garantizaran buenas prácticas de manejo para los animales y el cuidado de los operarios. También se consideró la posibilidad de contar con mano de obra para el manejo y sujeción de animales en los momentos de muestreo, a fin de asegurar los resultados hasta el final del ensayo.

Durante el año 2014 se analizaron 3 establecimientos de engorde a corral (EC1, 2 y 3), una recria con suplementación (RS1) y una recria a corral (RC1). En el año 2015 se evaluaron 2 establecimientos de recria con suplementación (RS2 y 3) y 2 de recria a corral (RC2 y 3) (Ver Generalidades Materiales y Métodos, Establecimientos pg 13).

## **A – FACTORES DE RIESGO: VARIABLES CORRESPONDIENTES AL ANIMAL Y VARIABLES DE MANEJO**

### **Materiales y Métodos**

Para la recolección inicial de datos se realizó una encuesta al momento de ingreso de los animales a las invernadas, a administradores y/o propietarios de las invernadas (Anexo II) a fin de obtener información sobre variables de los animales y de manejo consideradas como factores de riesgo de CRB.

Como variable de los animales, se tuvo en cuenta el peso vivo al ingreso a la invernada. Para analizar la información se clasificaron los animales en 3 categorías según el riesgo de sufrir CRB: terneros con peso igual o inferior a 180 kgPV=riesgo alto; terneros entre 181 y 230 kgPV=riesgo medio y terneros con pesos superiores a los 230 kgPV=riesgo bajo (Babcock *et al.*, 2010). Para las variables de manejo, se consideró como inicio de las invernadas el momento de inicio de la alimentación. Entre las variables de manejo, por un lado se tuvieron en cuenta aquellas actividades generadoras de estrés como destete, vacunación, desparasitación, castración, marcación y transporte en camión si estas se realizaron dentro de los 30 días previos al inicio de las invernadas (Cole *et al.*, 1982; Fulton *et al.*, 2002). Por otro lado, se consideraron también otras prácticas de manejo como la mezcla de animales provenientes de diferentes campos de cría, la separación de terneros y formación de grupos al ingreso en función al peso vivo (Martín *et al.*, 1982), el acostumbramiento a la nueva dieta y la presencia de reparo en los corrales.

Posteriormente se continuó recolectando información a través de visitas cada 15 días durante los 2 primeros meses y luego una vez por mes hasta finalizado el estudio. Durante las visitas se recorrieron los corrales o potreros para observar presencia de barro, hacer lectura de materia fecal y de comederos lineales para monitorear la alimentación (Anexo II) (Bavera y Peñafort, 2006; Barra, 2009), observar el estado de las pasturas, el comportamiento animal y estado de salud. También se aprovecharon las visitas para dialogar con el responsable de las invernadas sobre el desarrollo de las mismas.

La fuerza de asociación entre los casos clínicos de CRB (variable respuesta) y los potenciales factores de riesgo (variables predictoras) se interpretó a partir del odds-ratio, calculado para cada variable de manera puntual y con un intervalo de confianza del 95%. Para ello se utilizó un modelo de regresión logística. A fin de nivelar el desbalance generado por la cantidad de animales en cada invernada, se trabajó esta variable dentro del modelo como efecto aleatorio. Se utilizó el programa RStudio® (versión 3.5.3).

## Resultados

La cantidad total de animales encerrados en las 9 invernadas en estudio fue de 592, variando entre un mínimo de 27 y un máximo de 120 animales por invernada. Las razas fueron Hereford, Aberdeen Angus y sus cruza, con la excepción de un establecimiento con animales cruza raza Charolais. El peso mínimo promedio de ingreso fue 130 kgPV y el máximo de 200 kgPV. En 7 invernadas ingresaron animales con un peso promedio igual o inferior a 180 kgPV, en las 2 restantes el peso promedio de ingreso fue de 190 y 200 kgPV (Tabla 4).

**Tabla 4:** Edad promedio en días de los animales al ingreso a las invernadas en estudio y peso vivo promedio de los mismos.

Invernada	Edad promedio a la llegada a las invernadas (días)	Peso Vivo Promedio (kg)
EC1	180-240	173
EC2	180-240	200
EC3	150-210	130
RS1	120-180	153
RS2	180-240	140
RS3	180-240	180
RC1	180-240	140
RC2	150-210	180
RC3	180-240	190

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral

Las medidas de manejo adoptadas variaron para cada invernada.

Los resultados de la presencia/ausencia de las medidas generadoras de estrés dentro de los 30 días previos al ingreso a la invernada, se presentan resumidos en la Tabla 5. A cada variable se le asignó una puntuación para luego generar un índice general sobre los 5 puntos totales posibles. Los cuadros de CRB se observaron en la EC2 cuyo índice fue de 4/5 y en RS1 y RC2 con un índice de 1/5 cada una.

También se elaboró un índice en función a la presencia/ausencia de los factores considerados de riesgo. La puntuación se basó en 6 puntos totales posibles. Puntajes 1 y 2 fueron indicativos de riesgo bajo, puntajes 3 y 4 de riesgo medio y puntajes 5 y 6 de riesgo alto. Los resultados se observan en la Tabla 6. Los cuadros de CRB se observaron en EC2 con riesgo bajo

(puntaje 2), en RS1 con riesgo medio (puntaje 4) y en RC2 con riesgo alto (puntaje 5).

**Tabla 5:** Presencia/Ausencia de factores generadores de estrés 30 días previos al inicio de la alimentación.

Pract Inv	Castración	Marcación	Manejo Sanitario <sup>1</sup>	Destete	Transporte		Índice	
					Distancia (km)	Tipo		
EC1	0	1	1	1	1	50	Camión	4/5
EC2*	1	0	1	1	1	800	Camión	4/5
EC3	0	0	1	1	0	-	-	2/5
RS1**	0	0	1	0	0	-	-	1/5
RS2	1	0	1	1	1	70	Camión	4/5
RS3	0	0	0	0	0	-	-	0/5
RC1	0	0	1	1	1	70	Camión	3/5
RC2*	0	0	1	0	0	-	-	1/5
RC3	0	0	1	0	0	-	-	1/5
<b>TOTAL</b>	<b>2/9</b>	<b>1/9</b>	<b>8/9</b>	<b>5/9</b>	<b>4/9</b>			
<b>OR</b>	<b>1,99</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>0,58</b>		<b>0,77</b>		
<b>IC 95%</b>	<b>0,26-15,01</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>0,07-4,8</b>		<b>0,10-5,82</b>		

Pract: Práctica de manejo; Inv: Código identificación de invernada; EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; \* : invernadas donde se observaron casos clínicos de CRB; ; \*\*: Invernada donde se observaron casos de CRB y queratoconjuntivitis; OR: Odds ratio; IC95%: Intervalo de confianza 95% para ajustar OD; ---: Sin valor, porque una forma de la variable predictora toma valores iguales a cero; <sup>1</sup>: En esta variable se incluyen la aplicación de vacunas anticlostridial y/o administración de antiparasitarios internos, externos y/o contra *Fasciola hepatica*, vía oral o inyectable



**Tabla 6:** Presencia/Ausencia de variables de manejo en las invernadas en estudio.

Var man Inv	Estrés <sup>a</sup>	Peso vivo al ingreso <sup>b</sup>	Mezcla de animales de diferentes orígenes <sup>c</sup>	Formación de lotes <sup>d</sup>	Acostumbramiento a nueva dieta <sup>e</sup>	Reparo <sup>f</sup>	Indice
EC1	1	1	0	1	0	0	3
EC2*	1	0	0	0	1	0	2
EC3	1	1	0	1	0	1	4
RS1**	1	1	0	1	0	1	4
RS2	1	1	1	1	0	0	4
RS3	0	1	0	1	0	1	3
RC1	1	1	1	1	0	1	5
RC2*	1	1	0	1	1	1	5
RC3	1	0	1	1	0	1	4
<b>OR</b>	---	<b>0,62</b>	---	<b>0,25</b>	<b>4,07</b>	<b>0,81</b>	
<b>IC 95%</b>	---	<b>0,07-5,13</b>	---	<b>0,03-2,24</b>	<b>1,01-16,46</b>	<b>0,11-5,89</b>	

Var man: Variables de manejo; Inv: Código de identificación de invernada; EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; \* : Invernadas donde se observaron casos clínicos de CRB; \*\*: Invernada donde se observaron casos de CRB y queratoconjuntivitis; OR: Odds ratio; IC95%: Intervalo de confianza al 95% para ajustar OD; ---: Sin valor, porque una forma de la variable predictora toma valores iguales a cero.

<sup>a</sup>: Medidas de manejo generadoras de estrés 30 días previos al ingreso a las invernadas: 0=ausencia; 1= presencia.

<sup>b</sup>: Peso vivo promedio al ingreso de las invernadas: 0= entre 181 y 230 kgPV; 1= inferior a los 180 kgPV.

<sup>c</sup>: Mezcla de animales provenientes de diferentes campos de cría/orígenes: 0=no se mezclaron; 1= se mezclaron.

<sup>d</sup>: Formación de lotes de animales en función al peso vivo ingreso de cada animal: 0= se formaron lotes; 1=no se formaron lotes.

<sup>e</sup>: Acostumbramiento de los animales a la nueva dieta: 0= se acostumbraron; 1=no se acostumbraron.

<sup>f</sup>: Reparos: 0= presencia; 1=ausencia.

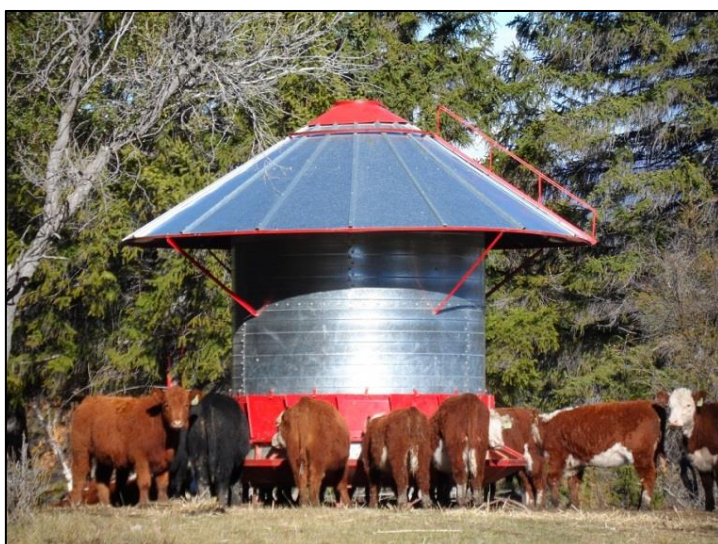


**Figura 6:** Engorde a corral 1, terneros comiendo la ración en comedero lineal bajo reparo.

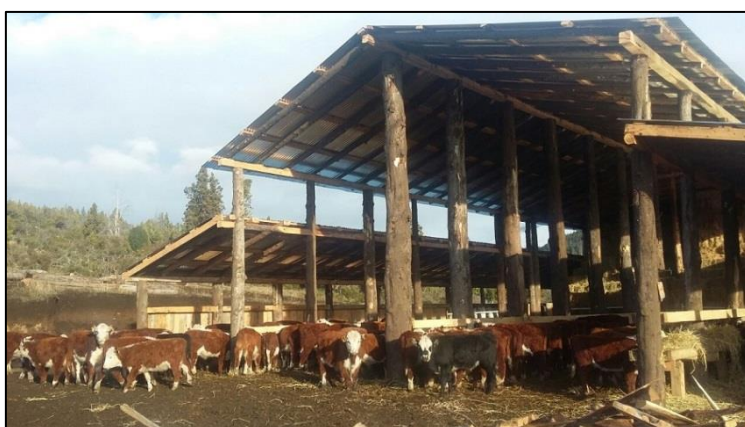
Nótese la presencia de piedra como relleno del corral.



**Figura 7:** Engorde a corral 3, animales alimentados con balanceado comercial disponible en silo comedero de autoconsumo y heno de avena ofrecido en el suelo.



**Figura 8:** Recría con suplementación 1, animales alimentados con balanceado comercial disponible en silo comedero de autoconsumo.



**Figura 9:** Recría con suplementación 2, con galpón de reparo para los terneros y lugar de suplementación con heno de alfalfa



**Figura 10:** Recría a corral 1, terneros alimentados con grano de cebada y núcleo proteico-mineral en comedero lineal de lona.



**Figura 11:** Recría a corral 3, terneros alimentándose con silo bolsa con reja de autoconsumo. Nótese el barro alrededor de la boca de la bolsa

## Discusión

No se observó un patrón en cuanto a la presencia de factores generadores de estrés previos a los 30 al ingreso de los animales a las invernadas y tampoco con la presencia de variables de manejo.

En relación a las razas presentes, en 2 de las 3 invernadas donde se observaron casos clínicos de CRB tenían razas cruzas Hereford x Aberdeen Angus y/o x Charolais. Si bien este estudio no fue diseñado para evaluar esta variable, podría considerarse que la heterocigosidad no fue un factor de resistencia a CRB (OR=0,54; IC95%=0,08-3,73). Esto concuerda con lo expresado por Snowden *et al.* (2006) en un trabajo realizado en terneros de destete. En Chubut, y en la zona de estudio en particular, el 80% de los bovinos son de raza Hereford, con un crecimiento sostenido de la raza Aberdeen Angus (Plan Ganadero Chubut, 2017). Hay trabajos que describen mayor susceptibilidad de la raza Hereford a CRB respecto de la Aberdeen Angus y sus cruzas (Cusack *et al.*, 2007), sin embargo y al igual que Martin *et al.* (1982), en este trabajo no se observó relación entre razas presentes y la ocurrencia de casos clínicos de CRB.

En 2 de las 3 invernadas con casos clínicos de CRB, el peso vivo promedio de los animales al ingresar a las invernadas fue igual o inferior a 180 kg. Si bien este fue considerado el límite inferior, por debajo del cual aumentaba el riesgo de enfermar (Backok *et al.*, 2010), no pueden vincularse los bajos pesos a los casos de CRB (Tabla 6). Esto podría explicarse ya que a partir de categorizar las invernadas según el criterio de Babcock *et al.* (2010), en 7 de las 9 invernadas los animales presentaban un peso promedio que los clasificaba como de riesgo alto, en 2 de las 9 como de riesgo medio y ninguna de riesgo bajo. Reforzando esta idea, Galyean *et al.* (1999) y Noström *et al.* (2000) plantean que animales que ingresan a los sistemas intensivos con menos de 200 kgPV tienen mayor incidencia de CRB. Tomando este nuevo criterio, en las 9 invernadas analizadas, los terneros tuvieron riesgo alto de presentar casos de CRB, hecho que sólo ocurrió en el 33% del total. Esto coincide con la falta de asociación negativa entre la categoría de peso y la mortalidad observada por Booker *et al.* (1999) y Babcock *et al.* (2010). En nuestro estudio, esto quizás se deba a que los pesos de los animales no fueron indicativos de la edad de los mismos (Tabla 4) y por lo tanto tampoco lo fueron de una mayor susceptibilidad a presentar CRB tal como está planteado por Sanderson *et al.* (2008) y Babcock *et al.* (2010). A partir de los datos de este estudio se propone una categorización acorde a la realidad regional en relación al peso de los animales al ingreso a las invernadas y su posible asociación con problemas de salud: menores a 150 kg de riesgo alto; entre 151 y 180 kg de riesgo medio y mayores a 180 kg de riesgo bajo. Esto surge de analizar el peso promedio de 165 kg observado

en este estudio con extremos de 130 a 200 kg. Tal como se describió en la introducción, la zona de valles concentra tanto terneros provenientes de los campos de la cordillera como de la estepa. Los pesos de destete para el oeste de Chubut estén entre 180 y 200 kg, mientras que para los terneros provenientes de la meseta son de entre 150-180 kg (INTA, 2015).

No se observó influencia del tipo de invernada en la ocurrencia de casos clínicos de CRB (OR=0,77; IC95%=0,25-2,32). Rossanigo *et al.* (2009) observaron una situación similar en engordes a corral de tipo “caseros” y en establecimientos con suplementación sobre pasturas. Los tipos de engordes descritos por Rossanigo, son similares en cuanto a manejo y cantidad de animales, a las invernadas identificadas en el presente trabajo como engordes a corral/recrías a corral y recrías con suplementación, respectivamente.

En este estudio, el destete, definido como la acción de separar a los terneros de sus madres y trasportarlos de manera inmediata, ya sea en camión o en tropa, a otro potrero dentro del campo de cría o a otro campo alejado geográficamente, dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación, fue una práctica habitual observada. Aun cuando este acto está definido como generador de estrés (Duff y Galyean, 2007), en este trabajo el destete no parece ser un factor influyente en el desencadenamiento de los casos clínicos de CRB (Tabla 5). De hecho, en la invernada donde se observó el brote de queratoconjuntivitis (RS1) y aquella donde se observaron casos de CRB dentro de los primeros 45 días de iniciada la alimentación (RC2), el destete dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación no fue una práctica de manejo presente.

La administración de antiparasitarios, ya sea por vía oral o subcutánea, y/o la aplicación de vacunas contra enfermedades clostridiales dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación fueron las prácticas más implementadas. El momento de administración coincidió con el ingreso de los animales a las invernadas. Estas prácticas sanitarias parecen no tener influencia en la ocurrencia de casos clínicos de CRB (Tabla 5). Esto se contradice con las ventajas descriptas por Duff y Galyean (2007) y Step *et al.* (2008), sobre acondicionar los animales entre 30 y 45 días previos al ingreso a las invernadas.

En una de las 9 invernadas se marcaron y en otra se castraron los terneros dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación. Aun cuando estas prácticas son conocidas generadoras de estrés (Pinchak *et al.*, 2004; Duff y Galyean, 2007; Apóstolo *et al.*, 2018), en este trabajo parecen no tener influencia en la ocurrencia de casos clínicos de CRB ni en la circulación de los tres virus en estudio (Tabla 5).

Respecto al transporte de los animales, en este trabajo se observaron casos clínicos de CRB en una de las 4 invernadas que transportaron terneros dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación. En esta, la distancia recorrida fue de 800 km y con un tiempo entre carga,

traslado y descarga de 18 horas, mientras que en las otras 3 invernadas las distancias recorridas oscilaron entre 50 y 70 km y el tiempo transcurrido fue de 4 horas aproximadamente, lo que sugeriría, que la distancia recorrida podría tener relación con la presentación de CRB. Sin embargo, más allá de la notable diferencia en cuanto a la distancia recorrida en esta única invernada, no se observó asociación entre el transporte de animales dentro de los 30 días del inicio de la alimentación y la ocurrencia de casos clínicos de CRB (Tabla 5). Esto es similar a lo hallado por Shake *et al.* (1980), quienes no observaron ninguna relación entre un rango entre 80 a 1600 km de transporte y la incidencia de CRB. En este sentido, Cusack *et al.* (2003) plantean que la distancia de transporte no se relaciona directamente con la salud y el rendimiento cuando el viaje dura 24 horas o menos, como ocurrió en todas las invernadas en las que los animales fueron transportados en este trabajo.

En este estudio en las 3 invernadas con casos clínicos de CRB y queratoconjuntivitis los terneros provenían de campos de ciclo completo. Para Martín *et al.* (1982), Sanderson *et al.* (2008) y Taylor *et al.* (2010) las invernadas donde se mezclan animales de diferentes orígenes presentan mayor riesgo de morbilidad respiratoria, probablemente debido al estrés a causa de la interacción social con nuevos animales y/o a una mayor exposición de animales susceptibles a agentes patógenos a partir del contacto con animales infectados. La falta de relación entre la mezcla de animales y casos de CRB quizás se deba a que esta práctica en general, no es habitual en el Valle 16 de Octubre, donde las invernadas forman parte de sistemas productivos de ciclo completo, aun cuando los lugares de invernada pueden estar distantes de los campos de cría (Tabla 6).

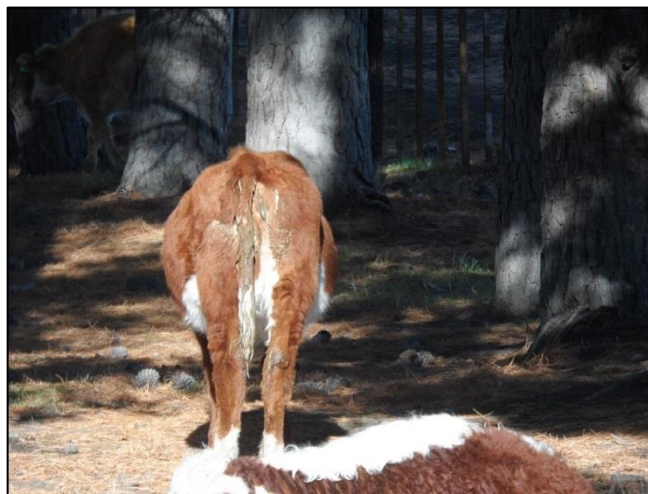
La formación de lotes de terneros se llevó a cabo en una sola invernada, y en esta se observaron casos clínicos de CRB. El estrés del inicio de la alimentación se manifiesta con la disminución del consumo (Loerch y Fluharty, 2000), que se ve potenciado por la competencia por el alimento entre los animales, por ello la formación de lotes se aplica como una estrategia de protección frente a grupos heterogéneos en cuanto a peso, edad y por ende susceptibilidad a CRB. En la invernada donde se formaron lotes y los animales enfermaron, los casos de CRB se observaron a los 63 días de iniciada la alimentación, por lo que no necesariamente la formación de lotes no resultó en una medida protectora (Tabla 6). La baja implementación de esta práctica se debió a que los lotes de terneros en las diferentes invernadas fueron homogéneos en cuanto al peso. A esto se suma lo analizado con anterioridad respecto de los pesos de los animales al ingreso a las invernadas, donde los mismos no fueron indicativos de edad y tampoco de mayor riesgo de CRB.

En todas las invernadas se tuvo en cuenta el acostumbramiento de los animales a la nueva dieta, sólo que en 2 de las 9 invernadas esta medida no fue implementada correctamente dando lugar a la ocurrencia de casos clínicos de acidosis y muerte (Figuras 12 y 13). En la primera invernada, si bien se respetó el tiempo de apertura de las bocas del comedero de autoconsumo, no hubo oferta suficiente de fibra a través de rollos de pastura. En la segunda invernada no se respetó el tiempo de apertura de las bocas del comedero de autoconsumo, generando la muerte de 5 animales. Cusack *et al.* (2003) y Cusack y Mahony (2016) plantean que los animales que reciben dietas en la invernada con alta proporción de granos tienen mayor predisposición a CRB debido al desarrollo de acidosis metabólica. En este estudio se observó asociación entre la falta de acostumbramiento y los casos clínicos de CRB (Tabla 6). Sin embargo, resulta necesario destacar que en una de las invernadas los casos de CRB se presentaron 55 días posteriores a la recuperación del cuadro de acidosis, mientras que en la otra se presentaron 30 días antes del problema de acidosis, por lo que resulta difícil explicar esta asociación biológicamente.

**Figura 12:** Engorde a corral 2, materia fecal tipo 1 observada durante cuadro de acidosis clínica. Nótese la consistencia líquida de la materia fecal y su falta de forma.



**Figura 13:** Engorde a corral 2, animal de pie con flanco izquierdo distendido durante cuadro de acidosis clínica.



En las 3 internadas donde se observaron casos clínicos de CRB, estos tuvieron lugar, en una de ellas a los 68 días y en otra a los 116 días post transporte y llegada de los terneros a las internadas. Estos momentos de presentación de casos clínicos de CRB no coinciden con lo planteado por Smith (1998), Thompson *et al.* (2006), Babcock *et al.* (2009) y Taylor *et al.* (2010), que describen que la mayor cantidad de casos clínicos de CRB ocurren durante los primeros 45 días post arribo a las internadas. En la internada restante, los casos de CRB se observaron a los 30 días post arribo, justo al momento del inicio de la internada. La diferencia entre este trabajo y la bibliografía citada es que en esta última la fecha de arribo o llegada de los terneros a las internadas se toma como día cero (0), mientras que en la metodología adoptada en este trabajo se consideró como día cero (0), el inicio de la alimentación de engorde, recría o suplementación

Para Duff y Galyean (2007) y Step *et al.* (2008) los efectos sobre la morbilidad y mortalidad del CRB pueden reducirse a través de acciones preventivas denominadas “preacondicionamiento”, siempre que las mismas se lleven a cabo entre 30 y 45 días previos al ingreso a las internadas. En este sentido Step *et al.* (2008) plantean que el destete en el campo de origen, 45 días antes de transportarlos a la internada mejora la salud y el rendimiento. En el presente trabajo, el destete y el transporte siempre se realizaron simultáneamente. La diferencia entre las internadas fue que en 4 de las 9, los animales se mantuvieron luego del destete, transporte y llegada, por períodos iguales o superiores a 30 días, en potreros pastoreando pasturas naturales o consumiendo heno en rollos hasta que comenzó el encierre en corrales y/o inicio de la alimentación intensiva. En este estudio, este período se consideró como período de



acondicionamiento. Para ello se tuvo en cuenta lo descrito por Lofgreen (1983) sobre la reducción de la morbilidad y la mortalidad cuando los terneros se alimentan solo con heno de gramíneas a la llegada a las invernadas. A su vez, Fell *et al.* (2007), observaron que mantener terneros en corrales de acondicionamiento es útil para el fortalecimiento de los vínculos sociales entre los animales y la familiarización con el manejo diario de la invernada. En el presente trabajo, al considerarse como inicio de las invernadas el momento de inicio de la alimentación sin tener en cuenta los días de acondicionamiento, los casos de CRB tuvieron lugar a los 63 días de iniciada la alimentación en una de las invernadas y a los 70 días en la otra. Es decir, aún bajo este análisis los casos clínicos de CRB se observaron luego de los primeros 45 días.

En el presente trabajo, el acondicionamiento no fue un factor de protección frente a la ocurrencia de CRB (OR=0,58; IC95%=0,07-4,81).

No se observó relación entre la presencia/ausencia de reparo y la ocurrencia de casos clínicos de CRB (Tabla 6). El Valle 16 de Octubre, además de las temperaturas bajas durante el período invernal (2,9°C temperatura media; SIPAN, 2019) presenta una estacionalidad marcada en cuanto a la distribución de las precipitaciones, con concentración de los mayores volúmenes en los meses de mayo, junio y julio (Colombani y Arbuniés, 2008). Las precipitaciones actúan de manera directa como factor de estrés al disminuir temporalmente el consumo de alimento en un 10-30% (NRC, 1981). Además, el agua acumulada sobre el animal desplaza el aire retenido en el pelaje y lo aplana, reduciendo así la profundidad y su función como aislante, a la vez que aumenta la pérdida de calor por conducción y convección (Balling, 1980) (Figura 16). En este sentido, Arias *et al.* (2008) y Cusack y Mahony (2016) plantean que la temperatura ambiental por sí sola no es una adecuada expresión de estrés térmico ya que es alterada en climas fríos por la acción del viento, las precipitaciones y la humedad. El National Research Council (1981) describe que animales de 6 meses de edad, con ganancia de peso de 500 gramos diarios, mojados y con viento superior a los 16 km por hora, (km/hora) presentan una temperatura crítica inferior (TCI) de 9,9°C.

Son pocos los trabajos sobre estrés térmico que focalizan sobre las condiciones de frío, quizás porque el bovino es una especie que se adapta bien a condiciones frías (Young, 1981; NRC, 1981), sobre todo las razas británicas (Bavera, 2011) que son las que se evaluaron en este trabajo. A nivel país, la ausencia de estudios sobre climas fríos puede deberse a que la zona donde se concentran las invernadas es tradicionalmente la Pampa Húmeda de clima templado, con un desplazamiento en la actualidad hacia las regiones de noroeste y noreste de clima subtropical.

En este estudio, en el año 2014 se observaron casos de CRB en dos invernadas. En la primera los mismos ocurrieron hacia fines de junio. Durante los primeros 24 días de ese mes, momento en que se detectaron los casos clínicos, la lluvia acumulada fue de 100,4 mm; la temperatura máxima media fue de 7,3°C, con máximas absolutas que no superaron los 9,9°C durante 19 días y con una velocidad de viento máxima promedio de 23 km/hora (INTA, 2019). A partir de esta información se infiere que los animales en esta invernada estuvieron sometidos durante los días previos al inicio del brote a condiciones de estrés térmico. En esta línea, Cusack *et al.* (2007) hallaron que cuanto más baja fue la temperatura ambiente mínima diaria, mayor fue la incidencia de tratamientos diarios para CRB y también observaron una tendencia hacia una correlación significativa entre la velocidad máxima del viento y la incidencia diaria de CRB, aún con la aclaración de que son más relevantes las condiciones climáticas previas a la aparición de los casos clínicos, y que las condiciones climáticas severas al momento de la aparición de los cuadros de CRB sólo vuelven más notables los signos de la enfermedad.

En la segunda invernada el cuadro de CRB tuvo lugar a mediados de julio de 2014. Durante los primeros 13 días de ese mes, previo a la detección de casos clínicos, llovieron 5,8 mm de manera sostenida durante 10 días; la temperatura máxima media fue de 7,9°C, con temperaturas mínimas absolutas inferior a los 0°C por períodos entre 4 y 7 días. En este análisis, se tomó como TCI 0°C (Bavera y Beguet, 2003), debido a que la velocidad del viento máxima promedio fue inferior a los 16 km/hora (NRC, 1981). Es decir, las condiciones críticas fueron la persistente humedad combinada con las bajas temperaturas (Balling, 1980; Ribble *et al.*, 1995).

En 2015 los casos de CRB se observaron en una sola invernada a fines de mayo. Durante 7 días previos a la detección de los casos llovieron 121,5 mm (77% acumulado de ese mes). Durante los primeros 21 días de ese mes, momento en que se detectaron los casos clínicos, la temperatura media fue de 8,5°C, con máxima de promedio de 13,9°C y mínima promedio de 4°C y con una velocidad de viento máxima promedio de 29,8 km/hora. En este caso, la humedad y el viento parecen haber sido importantes para la pérdida de calor. Se puede pensar, además, que en este caso en particular el volumen de las precipitaciones también actuó favoreciendo la formación de barro y de manera indirecta potenciando las pérdidas de calor al quedar este adherido a la superficie corporal (Arias *et al.*, 2008). Tanto en esta invernada como en otras evaluadas en este trabajo, se observó, aunque no se midió, la formación de barro sobre las superficies de los corrales o bien cerca de las bocas de los comederos en potreros de mayor superficie (Figuras 14 y 15). Está demostrado que el barro disminuye el consumo de alimento en un rango de 5 a 30%, según la profundidad del mismo (NRC, 1981) a la vez que reduce la ganancia diaria de peso vivo y aumenta el índice de conversión.

La presencia de las variables consideradas de riesgo, pierden fuerza como factores generadores de CRB debido a que se alejan del momento de ocurrencia de los casos clínicos, quedando en el análisis como factor común y coincidente con las fechas, la humedad persistente debido a las precipitaciones características de la zona en época invernal.



**Figura 14:** Barro acumulado alrededor de las bocas de un comedero de autoconsumo en una recria con suplementación.



**Figura 15:** Barro en la boca de una bolsa de silo con reja de autoconsumo. Nótese el pozo previo a la reja, la profundidad del mismo y la cantidad de barro adherido a la superficie corporal de los animales.



**Figura 16:** Animales con acumulación de agua sobre el pelaje.

## **B - DINÁMICA DE CIRCULACIÓN DEL HERPES VIRUS BOVINO 1, VIRUS DE PARAINFLUENZA BOVINA 3 Y VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA**

### **Materiales y Métodos**

Se seleccionaron al azar 15 terneros, de entre 6 a 8 meses de edad, en cada una de las 9 invernadas en estudio. Se utilizó el programa WinEpi<sup>®</sup> y se calculó para un nivel de confianza de 95%, un tamaño de población de 600 terneros, una prevalencia esperada del 40% y un error aceptable del 7% (De Blas *et al.*, 2000). Al total de los animales, se le tomaron muestras de sangre el día 0 (día de inicio de la invernada) y a los 30 y 60 días de iniciado el ensayo (Ver capítulo Diseño Experimental: Generalidades Materiales y Métodos). Se consideró el inicio de las invernadas, día 0, como el momento en que se comenzó a ofrecer el alimento ya sea para engorde o para recría.

De los 15 animales de cada invernada, se seleccionaron al azar 5 a los cuales además de las muestras de sangre, se les tomaron muestras de secreciones nasales y oculares en los mismos días (0, 30 y 60) (Ver capítulo Diseño Experimental: Materiales y Métodos: Generalidades, pg12).

Se utilizó un diseño no experimental, prospectivo, longitudinal de cohorte comparativo (Basualdo *et al.*, 2005).

Se consideró existencia de circulación viral en cada invernada a la presencia de seroconversión de al menos un ternero o bien cuando el aislamiento viral fue positivo. Este análisis se hizo para cada virus en particular.

Para los títulos de anticuerpos por invernada se calcularon las medias geométricas para BoHV1 y BPI3V y las medias aritméticas para BVDV, teniendo en cuenta todos los animales muestreados a los días 0, 30 y 60 del ingreso a la invernada (Patel, 2005; Streintemberger *et al.*, 2017). Se calcularon los desvíos estándar y los rangos de títulos de anticuerpos. Se utilizó el programa Microsoft Excel<sup>®</sup> (versión 2010).

La fuerza de asociación entre la existencia de circulación viral (variable respuesta) y los potenciales factores de riesgo (variables predictoras) se interpretó a partir de los odds-ratio, calculados para cada variable de manera puntual y con un intervalo de confianza del 95% junto al p-valor del test de Wald para un nivel de confianza del 95%. Para ello se utilizó un modelo de regresión logística. Se utilizó el programa Statistix<sup>®</sup> versión 8 (Statistix for Windows, 1985-2003). Los datos se presentan en el ANEXO II.

## Resultados

En este estudio se comprobó la circulación de BoHV1 en 2 invernadas, BPI3V en 8 y BVDV en 4 (Tabla 7).

La cantidad de invernadas con serología positiva para BoHV1 se sostuvo entre los días 0 y 30, y disminuyó al día 60. Para BPI3V todas las invernadas fueron positivas en los 3 momentos. Para BVDV la cantidad de invernadas positivas se sostuvieron en el tiempo (Tabla 8).

Las prevalencias individuales disminuyeron para BoHV1, aumentaron para BPI3V y se sostuvieron para BVDV (Tabla 9).

**Tabla 7:** Cantidad y porcentaje de invernadas en las que se observó circulación de BoHV1; BPI3V y BVDV y/o casos clínicos de CRB.

	Engorde a Corral	Recría con suplementación	Recría a Corral	Total de invernadas
<b>Circulación BoHV1</b>	1 (33,3%)	1(33,3%)	0	2
<b>Circulación BPI3V</b>	3 (37,5%)	3 (37,5%)	2 (25%)	8
<b>Circulación BVDV</b>	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4

**Tabla 8:** Prevalencia serológica por invernada para BoHV1, BPI3V y BVDV a los días 0, 30 y 60 de muestreo.

Virus	Día 0	Día 30	Día 60
<b>BoHV1</b>	4/9 (44%)	4/9 (44%)	2/9 (22%)
<b>BPI3V</b>	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)
<b>BVDV</b>	6/9 (66%)	6/9 (66%)	6/9 (66%)

**Tabla 9:** Prevalencia serológica por animal para BoHV1, BPI3V y BVDV a los 0, 30 y 60 de muestreo.

Virus	Día 0	Día 30	Día 60	Promedio
<b>BoHV1</b>	7,5%	6,3%	5,8%	6,5%
<b>BPI3V</b>	82,6%	97,6%	100%	93,1%
<b>BVDV</b>	69,8%	63%	66,7%	66,8%

**• BoHV1****-Serología**

En 5 invernadas (EC3, RS3, RC1, RC2 y RC3) no se detectaron anticuerpos contra BoHV1 en ningún animal en ninguna fecha de muestreo. En las 4 invernadas restantes (EC1, EC2, RS1 y RS2) se detectaron animales con anticuerpos contra BoHV1 en alguna de las fechas de muestreo (Tabla 10).

Si se toman las 4 invernadas en las que se detectaron animales seropositivos para BoHV1, se pueden observar 3 comportamientos a nivel rodeo en función a los tiempos de toma de muestra durante el período de estudio (Figura 17):

- 1- Del día 0 al 30, se observó en una invernada (RS1) un aumento en la media geométrica del título de anticuerpos debido a un aumento en la cantidad de animales positivos y los títulos de anticuerpos por animal. En otra invernada (RS2) la media geométrica del título de anticuerpos se mantuvo constante, con un solo animal positivo y cuyo título disminuyó. Esto se debió a que la cantidad de animales muestreados al día 30 disminuyó. En las 2 invernadas restantes (EC1 y EC2) las medias geométricas disminuyeron como así también disminuyeron la cantidad de animales positivos.
- 2- Del día 30 al 60, se observó en una invernada (RS1) el aumento en la media geométrica del título de anticuerpos debido a un aumento en la cantidad de animales positivos y los títulos de anticuerpos por animal. En otras dos invernadas (EC1 y RS2) no se observaron animales positivos al día 60 de muestreo. En la invernada restante (EC2) no se observaron variaciones entre los días 30 y 60.
- 3- Del día 0 al 60, se observó el aumento en la media geométrica del título de anticuerpos en una invernada (RS1) y la disminución en las 3 restantes (EC1, EC2 y RS2). La cantidad de animales positivos, aumentó en una sola invernada (RS1), mientras que en las 3 restantes (EC1, EC2 y RS2) disminuyó, siendo en 2 de estas todos los animales negativos al día 60.

En la única invernada donde la cantidad de animales positivos y los títulos aumentaron (RS1), se observó que entre los días 0 y 30, 2 animales de un total de 13, seroconvirtieron y uno lo hizo entre los días 30 y 60 (Tabla 11).

**Tabla 10:** Prevalencia serológica, media geométrica, desvío estándar y rango de los títulos de anticuerpos totales para BoHV1 para cada invernada a los días 0, 30 y 60 de muestreo.

<b>HERPES VIRUS BOVINO TIPO 1</b>				
<b>Invernada</b>	<b>Fecha muestreo</b>	<b>Prevalencia Serológica</b>	<b>Media geométrica de Ac Totales<sup>a</sup> ± DE</b>	<b>Rango de títulos de Ac totales<sup>a</sup></b>
<b>EC1</b>	<b>0</b>	13,3	0,21 ± 0,56	0 – 1,6
	<b>30</b>	6,7	0,11 ± 0,41	0 – 1,6
	<b>60</b>	0	0	-
<b>EC2</b>	<b>0</b>	20	0,32 ± 0,66	0 – 1,6
	<b>30</b>	6,7	0,15 ± 0,57	0 – 2,2
	<b>60</b>	7,1	0,16 ± 0,59	0 – 2,2
<b>EC3</b>	<b>0</b>	0	0	-
	<b>30</b>	0	0	-
	<b>60</b>	0	0	-
<b>RS1</b>	<b>0</b>	30,8	0,63 ± 1	0 – 2,2
	<b>30</b>	38,5	0,75 ± 1	0 – 2,8
	<b>60</b>	46,2	0,92 ± 1,1	0 – 2,8
<b>RS2</b>	<b>0</b>	6,7	0,15 ± 0,6	0 – 2,2
	<b>30</b>	9,1	0,15 ± 0,48	0 – 1,6
	<b>60</b>	0	0	-
<b>RS3</b>	<b>0</b>	0	0	-
	<b>30</b>	0	0	-
	<b>60</b>	0	0	-
<b>RC1</b>	<b>0</b>	0	0	-
	<b>30</b>	0	0	-
	<b>60</b>	0	0	-
<b>RC2</b>	<b>0</b>	0	0	-
	<b>30</b>	0	0	-
	<b>60</b>	0	0	-
<b>RC3</b>	<b>0</b>	0	0	-
	<b>30</b>	0	0	-
	<b>60</b>	0	0	-

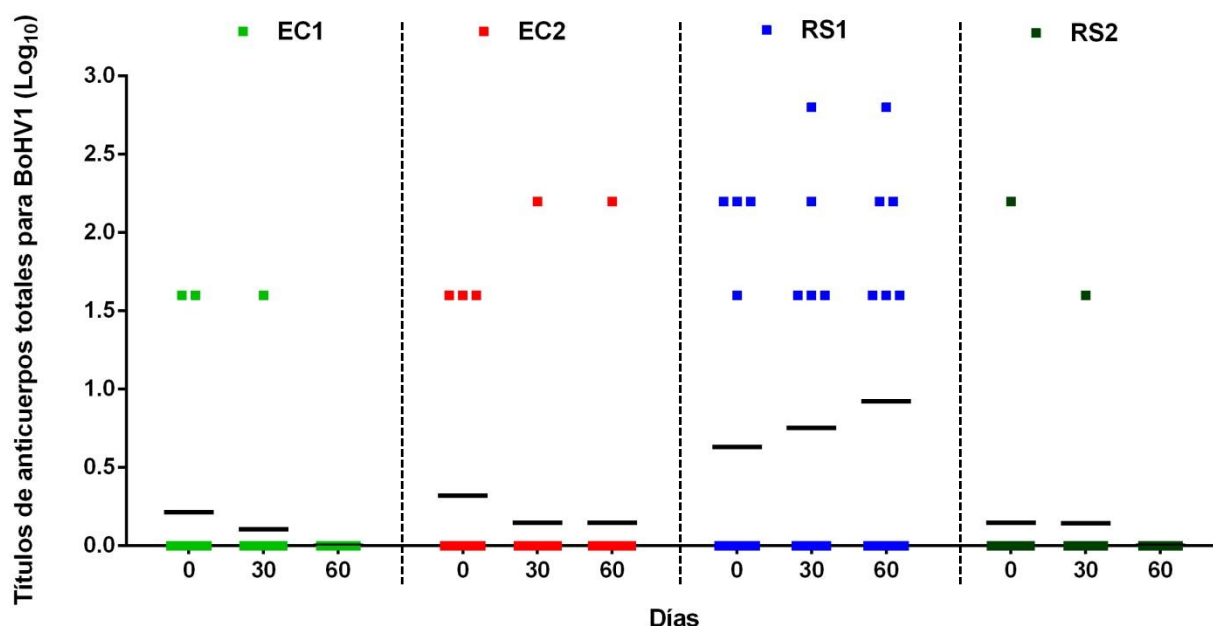
EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; Ac: Anticuerpos

<sup>a</sup> Expresado como log<sub>10</sub>

DE: Desvío estándar



**Figura 17:** Dinámica de anticuerpos totales para BoHV1 en las 4 invernadas serológicamente positivas para este virus.



Cada cuadrado representa un individuo; EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio; 60: sesenta días post-inicio y — media geométrica teniendo en cuenta todos los animales muestreados en cada momento. Las muestras de sueros se tomaron a los días 0, 30 y 60 del inicio de cada invernada y se evaluaron anticuerpos específicos contra BoHV1 mediante test de ELISA indirecto. Los títulos se expresan como  $\log_{10}$

**Tabla 11:** Cantidad de animales que seroconvirtieron para BoHV1 entre las fechas de muestreo en las 4 invernadas donde se detectaron animales seropositivos.

Intervalo de tiempo Invernada	0-30	30-60
EC1	0/15	0/15
EC2	0/15	0/14
RS1	2/13	1/13
RS2	0/7	0/6

EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio y 60: sesenta días post-inicio.

#### - Aislamientos BoHV1

Se obtuvieron 5 aislamientos de BoHV1 en 4 animales pertenecientes a 2 invernadas (EC2 y RS1) (Tabla 12). Todos los aislamientos de BoHV1 correspondieron al subtipo BoHV1.2.a

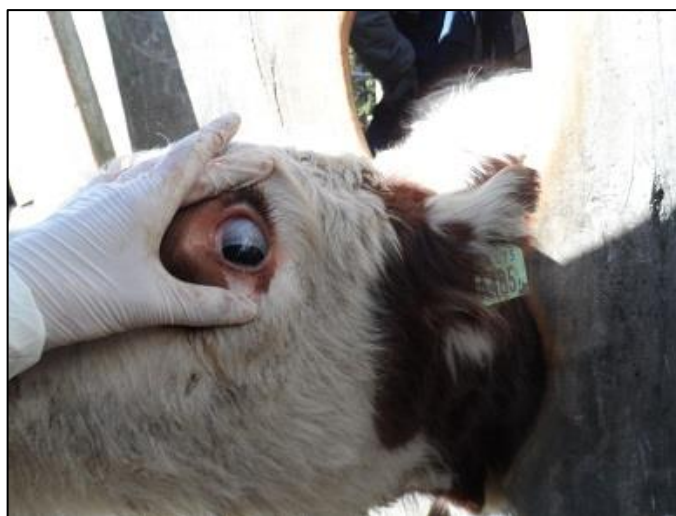
**Tabla 12:** Aislamientos de BoHV1 en 2 invernadas. Identificación de la invernada y del animal del cual se obtuvo el aislamiento, tipo de aislamiento según secreción de la cual se aisló, momento de toma de muestra y presencia y tipo de signos clínicos presentes al momento de tomar las muestras.

Invernada	Identificación Animal	Tipo de aislamiento	Fecha de muestreo	Signos clínicos
<b>EC2</b>	032	Nasal	0	NO
	142	Ocular	30	NO
<b>RS1</b>	491	Nasal	30	CONJUNTIVITIS
		Ocular	30	CONJUNTIVITIS
	485	Nasal	30	NO

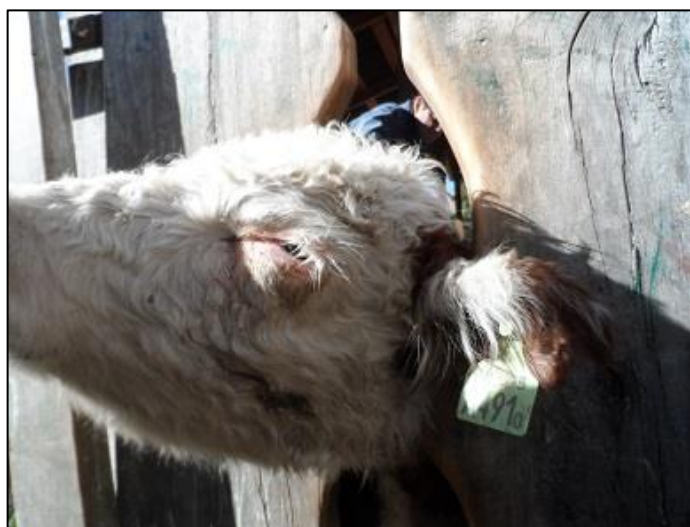
EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio.

El animal 485 era asintomático (Figura 18) y el animal 491 (Figura 19) presentaba conjuntivitis de tipo serosa al momento de la toma de muestras.

**Figura 18:** Animal 485 sin signos clínicos del que se aisló BoHV1 de secreción nasal.



**Figura 19:** Animal 491 con conjuntivitis serosa del que se aisló BoHV1 de secreciones nasales y oculares. Nótese la secreción serosa en la cara del animal y el blefaroespasmó a partir del cierre del ojo.



En EC2 no se observó seroconversión en los animales de los cuales se aisló BoHV1. En RS1 se observó seroconversión en un animal (491) (Tabla 13).

**Tabla 13:** Títulos de anticuerpos totales para BoHV1 en los animales de los cuales se aisló el virus en alguna de las fechas de toma de muestra.

Invernada	Identificación Animal	Fecha de Muestreo		
		0	30	60
EC2	032	1,6	2,2	2,2
	142	Neg	Neg	Neg
RS1	491	Neg	Neg	1,6
	485	Neg	Neg	Neg

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; Neg: Animal seronegativo (Materiales y Métodos: Generalidades); 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio.

#### - **Discusión dinámica de circulación de BoHV1**

El 44% de las invernadas, resultaron positivas a BoHV1. Este valor fue levemente inferior al 50% reportado por Perez Aguirreburualde (comunicación personal) en rodeos de cría del Valle 16 de Octubre en 2013.

La prevalencia serológica a nivel animal para BoHV1 a lo largo del estudio fue del 6,5%. Este valor es similar al 8,8% reportado por Odeón *et al.* (2001) en animales de entre 6 y 12 meses en la provincia de Corrientes, aunque es inferior al 24,8% informado por los mismos autores en animales de la misma edad en la provincia de Buenos Aires. También fue inferior a lo

reportado por Suarez *et al.* (2018) en campos de cría de la provincia de Salta, con prevalencias en animales adultos y jóvenes de 28,5%. Esta diferencia se amplía en Patagonia, donde Robles *et al.* (2015) observaron en bovinos de cría adultos y jóvenes de Neuquén, una prevalencia de 53,7%, y Perez Aguirreburualde (comunicación personal), que en campos de cría del noroeste del Chubut, observó una prevalencia de 52,3%. Las diferencias que surgen podrían estar dadas por características productivas de cada zona y por la categoría animal estudiada. En este sentido, Odeón *et al.* (2001) observaron en Buenos Aires prevalencias para BoHV1 de 24,8% en animales menores de 1 año y de 84,1% en animales mayores de 2 años. En Uruguay, Guarino *et al.* (2008) encontraron menor prevalencia para BoHV1 en vaquillonas que en vacas adultas.

La prevalencia serológica a nivel animal para BoHV1 disminuyó entre cada momento de toma de muestra de 7,5% el día 0, al 6,3% el día 30 y luego al 5,8% el día 60. Estos hallazgos, no coinciden con el trabajo de Streintenberger *et al.* (2017) en la provincia de Buenos Aires que reporta valores del 13% al día 0 y de 25% al día 25, y el de Apóstolo *et al.* (2017) en el Valle 16 de Octubre que reporta el 27,4% al día 0.

En el intento de comprender si los títulos de anticuerpos hallados correspondían a anticuerpos calostrales o eran resultado de una infección aguda, se tuvo en cuenta por un lado la edad de los terneros al momento de la primera toma de muestra y por el otro la dinámica de los anticuerpos en cada una de las invernadas.

Por un lado, en terneros con 180-240 días de vida, era esperable no encontrar anticuerpos calostrales si se tiene en cuenta lo hallado por Fulton *et al.* (2004) y Menantau-Horta *et al.* (1985) que indican que entre los 123 a 170 días de edad en terneros sin vacunar los anticuerpos calostrales específicos ya no son detectables. Si bien en el presente trabajo los terneros eran mayores en edad, la persistencia de anticuerpos calostrales estaría relacionada con la cantidad de anticuerpos transferidos de manera pasiva (Fulton *et al.*, 2004 y Ezzi *et al.*, 2011). Aunque no se cuenta con los datos de las madres de los terneros ingresados en las invernadas, se sabe que en la zona de estudio hay circulación viral en los animales adultos (Perez Aguirreburualde, comunicación personal), por lo que es de esperar una elevada transferencia de inmunidad a los terneros y en consecuencia un tiempo prolongado de persistencia.

Por otro lado, la cantidad de animales positivos disminuyó en 3 de las 4 invernadas seropositivas al igual que las medias geométricas de los títulos de anticuerpos, lo que lleva a reforzar la idea de que se trataría de anticuerpos calostrales, ya que en el caso de que los anticuerpos detectados respondieran a una infección, debería detectarse un aumento en los títulos y eso aquí no ocurrió (van Nieuwstadt y Verhoeff, 1983; Kaashoek *et al.*, 1996 y Traveria *et al.*, 2011). En una de estas 3 invernadas se aisló BoHV1 de dos animales sin detectarse síntomas ni

una respuesta inmune en dichos animales y tampoco a nivel rodeo. Este cuadro podría observarse en una primoinfección en presencia de inmunidad calostrala (Lemaire *et al.*, 2000) o con bajos niveles de anticuerpos circulantes (Pastoret y Thiry, 1985). En estos casos, luego de la desaparición de los anticuerpos circulantes, pueden generarse animales portadores latentes que resultan negativos a la serología (falsos negativos) y en los cuales a partir de situaciones de estrés, BoHV1 puede reactivarse y generar ciclos de circulación viral (Lemaire *et al.*, 2000).

En la invernada restante de las 4 seropositivas, 2 animales seroconvirtieron y se obtuvieron 3 aislamientos de BoHV1, 2 de dichos aislamientos correspondieron a un animal con síntomas de conjuntivitis y uno a un animal sano que no seroconvirtió. La falta de evidencia de circulación de BoHV1 a nivel del rodeo pero si a nivel individual, pudo deberse a 3 posibles causas:

1-Ante la ocurrencia de una infección temprana, se produjo la supresión de una respuesta humoral a causa de la presencia los anticuerpos calostrales (Martin y Bohac, 1986; Hagglund *et al.*, 2006; Roshtkhari *et al.*, 2012).

2-Una insuficiente excreción del virus que no permitió la transmisión viral al resto de los animales (Pastoret y Thiry, 1985), situación común durante el período de reactivación de BoHV1 en animales con condición de portador latente.

3-Lo que se detectó a nivel individual fue el comienzo de la circulación del virus. Al analizar este punto, se desprende que al momento de seroconversión los terneros tenían entre 210 y 300 días de vida. Este hallazgo coincide con lo reportado por Travería *et al.*, (2011) y Zbrun *et al.*, (2011) que observaron en terneros en recría un mayor número de seroconversiones para BoHV1 a los 300-330 y 300-390 días de vida, respectivamente. Estos autores también observaron que todos los terneros fueron positivos a los 360 y 450 días, respectivamente. En esta invernada el seguimiento se hizo hasta los días 270-330 de vida de los animales, por lo que no se puede descartar que lo observado a nivel animal haya sido el comienzo de la circulación de BoHV1. Los aislamientos fueron del subtipo BoHV1.2.a, tanto en el estudio de cohorte como en el de casos y controles. En Argentina, Morano *et al.*, (2011) aislaron el subtipo 1.2.b de secreciones conjuntivales durante un brote de queratoconjuntivitis. En Patagonia, Maidana *et al.* (2018) identificaron aislamientos en bovinos con signos de queratoconjuntivitis, provenientes del noroeste de la provincia del Chubut como subtipo 1.2.b. Estos autores en el mismo trabajo identificaron aislamientos como subtipos 1.2.a, pero los mismos se obtuvieron de bovinos asintomáticos y provenientes de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. En el presente trabajo, los aislamientos del subtipo BoHV1.2.a provenían de 3 terneros asintomáticos y de 2 terneros con queratoconjuntivitis. Esto es consistente con los primeros aislamientos de BoHV1

en Patagonia que fueron caracterizados como BoHV1.2.a (Maidana *et al.*, 2020) y que se obtuvieron a partir de un brote de queratoconjuntivitis (Apóstolo *et al.*, 2017). Geográficamente, los aislamientos de BoHV1 corresponden a animales provenientes de las provincias del Chubut y Santa Cruz.

Respecto de otros países de Latinoamérica, hay evidencias de que el subtipo 1.2.a circula en Colombia (Piedrahita, 2005) y que también está ampliamente difundido en Brasil (Spilki *et al.*, 2004).

**• BPI3V****- Serología**

En todas las invernadas se detectaron anticuerpos en los tres momentos de muestreo (Tabla 14). Se observaron 3 comportamientos en función a los tiempos de toma de muestra durante el período de estudio (Figura 20):

- 1- Del día 0 al 30, se observó un aumento en la media geométrica de los títulos de anticuerpos en 8 invernadas (EC1, EC2, EC3, RS1, RS2, RS3, RC2 y RC3). En 5 (EC2, RS1, RS2, RC2 y RC3) se observó el aumento en la cantidad de animales positivos hasta alcanzar el 100% al día 30; en 2 invernadas (EC3 y RS3) todos los animales se mantuvieron positivos entre ambas fechas de muestreo y en la restante (EC1), si bien aumentó la cantidad de animales positivos, persistieron algunos negativos. En la novena invernada (RC1) la media geométrica del título de anticuerpos disminuyó y todos los animales se mantuvieron positivos.
- 2- Del día 30 al 60, se observó un aumento en la media geométrica de los títulos de anticuerpos en 3 invernadas (EC1, RS1 y RC3). Sólo en EC1 la cantidad de animales positivos aumentó hasta alcanzar el 100% ya que en RS1 y RC3 todos los animales ya eran positivos al día 30. En 4 invernadas (RS2, RS3, RC1 y RC2) la media geométrica de los títulos de anticuerpos se mantuvo y no se modificó la cantidad de animales positivos. En las 2 invernadas restantes (EC2 y EC3) la media geométrica de los títulos de anticuerpos disminuyó mientras que todos los animales se mantuvieron positivos.
- 3- Del día 0 al 60, se observó un aumento en la media geométrica de los títulos de anticuerpos en 8 invernadas (EC1, EC2, EC3, RS1, RS2, RS3, RC2 y RC3) y la disminución en la invernada restante (RC1). En todas las invernadas el 100% de los animales fueron positivos al día 60.

En 8 invernadas se observó circulación viral a partir de la seroconversión en los animales. En 7 esto ocurrió entre los días 0 y 30, mientras que en una también se dio entre los momentos 30-60 (Tabla 15).

**Tabla 14:** Prevalencia serológica, media geométrica, desvío estándar y rango de los títulos de anticuerpos totales para BPI3V para cada invernada a los días 0, 30 y 60 de muestreo.

VIRUS DE PARAINFLUENZA 3 BOVINA				
Invernada	Fecha muestreo	Prevalencia Serológica	Media geométrica de Ac Totales <sup>a</sup> ± DE	Rango de títulos de Ac totales <sup>a</sup>
EC1	0	53	0,97 ± 1,06	0 – 2,8
	30	80	1,46 ± 0,97	0 – 3,4
	60	100	2,54 ± 0,31	2,2 – 2,8
EC2	0	60	1,25 ± 1,42	0 – 3,4
	30	100	3,16 ± 0,31	2,8 – 3,4
	60	100	2,93 ± 0,26	2,8 – 3,4
EC3	0	100	1,94 ± 0,31	1,6 – 2,2
	30	100	2,72 ± 0,38	2,2 – 3,4
	60	100	2,64 ± 0,27	2,2 – 2,8
RS1	0	92,3	2,45 ± 0,89	0 – 3,4
	30	100	3,1 ± 0,31	2,2 – 3,4
	60	100	3,3 ± 0,23	2,8 – 3,4
RS2	0	57,1	1,04 ± 0,99	0 – 2,8
	30	100	2,97 ± 0,45	2,2 – 3,4
	60	100	2,98 ± 0,29	2,8 – 3,4
RS3	0	100	2,48 ± 0,58	1,6 – 3,4
	30	100	3 ± 0,30	2,8 – 3,4
	60	100	3 ± 0,31	2,8 – 3,4
RC1	0	100	3 ± 0,29	2,8 – 3,4
	30	100	2,8 ± 0	2,8
	60	100	2,84 ± 0,48	2,2 – 3,4
RC2	0	93,3	2,45 ± 0,8	0 – 3,4
	30	100	2,8 ± 0,45	2,2 – 3,4
	60	100	2,8 ± 0,49	2,2 – 3,4
RC3	0	86,7	2,35 ± 1,08	0 – 3,4
	30	100	3 ± 0,38	2,2 – 3,4
	60	100	3,21 ± 0,29	2,8 – 3,4

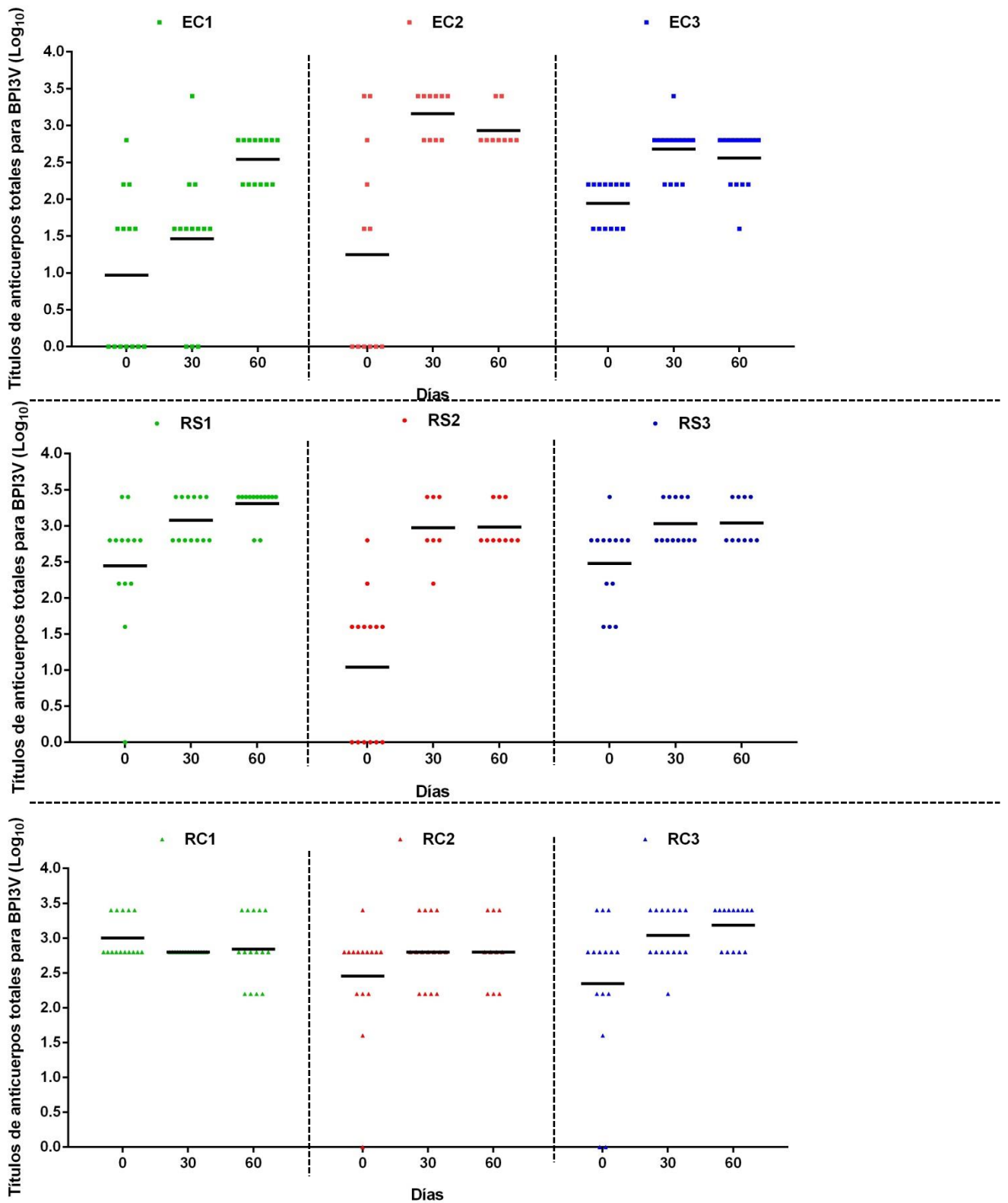
EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; Ac: Anticuerpos

<sup>a</sup> Expresado como log<sub>10</sub>

DE: Desvío Estándar



**Figura 20:** Dinámica de anticuerpos totales para BPI3V en las 9 invernadas bajo estudio.



Cada cuadrado, círculo y triángulo representan un individuo; EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio; 60: sesenta días post-inicio y — media geométrica teniendo en cuenta todos los animales muestreados en cada momento. Las muestras de sueros se tomaron a los días 0, 30 y 60 del inicio de cada invernada y se evaluaron anticuerpos específicos contra BPI3V mediante test de ELISA indirecto. Los títulos se expresan como Log<sub>10</sub>.

**Tabla 15:** Cantidad de animales que seroconvirtieron para BPI3V entre las fechas de muestreo

<b>Intervalo de tiempo Invernada</b>	<b>0-30</b>	<b>30-60</b>
<b>EC1</b>	4/14	6/13
<b>EC2</b>	9/12	0/10
<b>EC3</b>	7/14	0/15
<b>RS1</b>	3/13	0/13
<b>RS2</b>	9/10	0/10
<b>RS3</b>	5/13	0/13
<b>RC1</b>	0/15	0/15
<b>RC2</b>	2/15	0/11
<b>RC3</b>	4/15	0/14

EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación y RC: Recría a corral; 0: inicio a la invernada; 30: treinta días post-inicio y 60: sesenta días post-inicio.

#### - Aislamientos BPI3V

Se obtuvieron 8 aislamientos de BPI3V en 6 animales pertenecientes a 3 invernadas (EC1, EC2 y RS1) (Tabla 16).

Todos los aislamientos obtenidos correspondieron al genotipo A.

**Tabla 16:** Aislamientos de BPI3V en 3 invernadas. Identificación de la invernada y del animal del cual se obtuvo el aislamiento, tipo de aislamiento según secreción de la cual se aisló, momento de toma de muestra y presencia de signos clínicos al momento de la toma de muestras.

<b>Invernada</b>	<b>Identificación Animal</b>	<b>Tipo de aislamiento</b>	<b>Fecha de muestreo</b>	<b>Signos clínicos</b>
<b>EC1</b>	551	Nasal	30	NO
		Ocular	30	NO
	554	Nasal	30	NO
		Ocular	30	NO
	559	Nasal	30	NO
		566	Ocular	30
<b>EC3</b>	186	Nasal	0	NO
<b>RS1</b>	487	Nasal	30	NO

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio.

Cinco de los 6 terneros de los cuales se aisló BPI3V seroconvirtieron (Tabla 17).

**Tabla 17:** Títulos de anticuerpos totales para BPI3V en los animales de los cuales se aisló el virus en alguna de las fechas de toma de muestra.

Invernada	Identificación Animal	Fecha de Muestreo		
		0	30	60
EC1	551	Neg	1,6	2,8
	559	Neg	Neg	2,8
	564	Neg	Neg	2,8
	566	Neg	Pos	2,8
EC2	186	1,6	2,8	2,8
RS1	487	2,8	2,8	2,8

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; Neg: Animal seronegativo (Materiales y Métodos: Generalidades); Pos: animal positivo al screening sin titular (Materiales y Métodos: Generalidades); 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio.

#### - **Discusión dinámica de circulación BPI3V**

La prevalencia para BPI3V a nivel de las 9 invernadas fue del 100%. Este hallazgo coincide con un trabajo previo realizado en 5 invernadas en el Valle 16 de Octubre, en el que todas resultaron positivas (Apóstolo *et al.*, 2016).

La prevalencia a nivel animal para BPI3V fue aumentando de 82,6% (53-100%) el día 0, al 97,6% (80-100%) el día 30, hasta alcanzar el 100% el día 60. Estos valores son superiores al 77% reportado por Maidana *et al.* (2012), en rodeos de cría en nuestro país y al 62% informado por Apóstolo *et al.* (2016) en terneros al momento de ingreso a las invernadas en la zona del Valle 16 de Octubre. También son superiores a lo informado por Streintenberger *et al.* (2017) que en un trabajo similar, en un establecimiento de cría bovina en la provincia de Buenos Aires, observaron en terneros prevalencias del 31% al día 0 y del 50% a los 25 días. Las diferencias respecto de lo informado por Maidana *et al.* (2012) pueden explicarse por diferencias en cuanto a las zonas de estudio, ya que Robles *et al.* (2015) hallaron en bovinos adultos y jóvenes en la provincia de Neuquén prevalencias para BPI3V de 99%. A su vez las diferencias entre el presente trabajo y el de Apóstolo *et al.* (2016) y Streintenberger *et al.* (2017) pueden explicarse por los diferentes momentos en que se tomaron las muestras, ya que en estos últimos 2 casos reportados, el muestreo se realizó al ingreso de las invernadas y en el presente trabajo fue al inicio de la alimentación, que sucedió entre los 5 y 76 días posteriores al ingreso.

En 8 de las 9 invernadas se observaron seroconversiones para BPI3V y las medias geométricas de los títulos de anticuerpos aumentaron, mientras que en la restante, ningún animal seroconvirtió y la media geométrica se mantuvo estable entre los 3 momentos de muestreo.

En 5 de las 8 invernadas las seroconversiones no se reflejaron en un incremento de 2 o más veces de la media geométrica de los títulos de anticuerpos. Thomson *et al.* (1969) y Martin *et al.* (1989) encontraron en terneros que ingresaron en invernadas en Canadá, un aumento marcado de los títulos para BPI3V entre el día 14 y 21 postingreso. En el presente estudio, el período de acondicionamiento en las 5 invernadas previo al inicio de las tomas de muestra fue de entre 10 a 76 días, lo que genera la hipótesis que lo hallado fue la expresión de la última etapa de circulación viral que comenzó durante el acondicionamiento. Esto se refuerza con el hallazgo de prevalencias del 86,7% al 100% en el momento considerado final del acondicionamiento, que coincidió con el inicio de la alimentación y día 0 de toma de muestra, y del 100% al día 30.

En 3 invernadas de las 8 restantes las seroconversiones influyeron en el incremento de 2 o más veces las medias geométricas de los títulos de anticuerpos. En estas, los períodos de acondicionamiento fueron de entre 5 a 15 días. Las prevalencias al día 0 fueron entre el 53 y el 60%, alcanzando al día 30 al 100% en 2 de las invernadas, mientras que en la restante alcanzó valores del 80%. En esta última invernada, al día 60 todos los animales fueron seropositivos, y además se obtuvieron 6 aislamientos de BPI3V al día 30. Ante la hipótesis de que BPI3V comienza a circular inmediatamente luego del ingreso de los animales (Thomson *et al.*, 1969; Yates *et al.*, 1983; Martin *et al.*, 1989), en estas invernadas el menor tiempo de acondicionamiento permitió detectar el momento de máxima circulación viral.

En la invernada restante, las medias geométricas de los títulos para BPI3V se sostuvieron en niveles elevados, sin seroconversiones individuales y con prevalencias del 100% desde el día 0. Teniendo en cuenta que en esta invernada el período de acondicionamiento fue de 30 días, los hallazgos se explicarían también con el inicio de circulación viral a partir del ingreso de los animales.

Los factores de riesgo asociados con la circulación de BPI3V fueron el destete (OR=2,69, IC95%=1,28-5,66; p=0,0093) y el transporte (OR=2,3; IC95%=1,11-4,78; p=0,0250). A su vez se relacionó con la variable acondicionamiento previo, en donde su ausencia se asoció a la circulación de BPI3V (OR=2,69; IC95%=1,28-5,66; p=0,0093). Retomando la hipótesis de que BPI3V comenzó a circular inmediatamente luego del ingreso de los animales en todas las invernadas, la asociación entre esta variable y el destete, transporte y acondicionamiento se explicaría a través de una mayor cantidad de animales con indicadores individuales de circulación en aquellas invernadas con menor tiempo de acondicionamiento y por ende con

eventos como el destete y el transporte presentes dentro de los 30 días previos al inicio de la alimentación.

Tanto en el estudio de cohorte como en el de casos y controles, se aisló el genotipo A de BPI3V. Esto coincide con Maidana *et al.* (2012) que describen que los 3 genotipos (A, B y C) circulan en Argentina, A y C en bovinos y el genotipo B en búfalos, aunque no aportan información particular de Patagonia. No hay información sobre diferencias en cuanto a patogenicidad entre los diferentes genotipos (Neill *et al.*, 2015).

- **BVDV**

- **Serología**

En las 9 invernadas se pueden observar 3 comportamientos en la cantidad de animales positivos en función a los tiempos de toma de muestra durante el período de estudio (Tabla 18 y Figura 21):

- 1- Del día 0 al 30, en 2 invernadas (RC1 y RC3) aumentó la cantidad de animales positivos hasta alcanzar el 100% al día 30. En otras 3 (RS1, RS2 y RS3) la cantidad de animales positivos aumentó y en las 4 restantes (EC1, EC2, EC3 y RC2) disminuyeron, siendo en RC2 todos los animales negativos al día 30.
- 2- Del día 30 al 60, en 4 invernadas (EC2, RS1, RS2 y RC1) se observó el aumento en la cantidad de animales positivos. En RS2 todos los animales fueron positivos al día 60. En otras 2 invernadas (EC1 y RC3) la cantidad de animales positivos se mantuvo constante y en otras 2 (RS3 y EC3) disminuyó. En la invernada restante (RC2) se mantuvieron todos los animales negativos.
- 3- Del día 0 al 60, en 2 invernadas (RS2 y RC3) se observó el aumento en la cantidad de animales positivos, en las mismas todos los animales fueron positivos al día 60. En 2 invernadas (EC2 y RC1) la cantidad de animales se mantuvo constante y en las 5 (EC1, EC3, RS1, RS3 y RC2) restantes disminuyó. En RC2 todos los animales fueron negativos al día 60.

En 4 invernadas se observó circulación viral a partir de la seroconversión de los animales entre los momentos 0-30. En 2 de estas invernadas, además se observó seroconversión entre los momentos 30-60 (Tabla 19).

**Tabla 18:** Prevalencia serológica, títulos promedios, desvío estándar e intervalo de confianza para BVDV en cada invernada, a los días 0, 30 y 60 de muestreo.

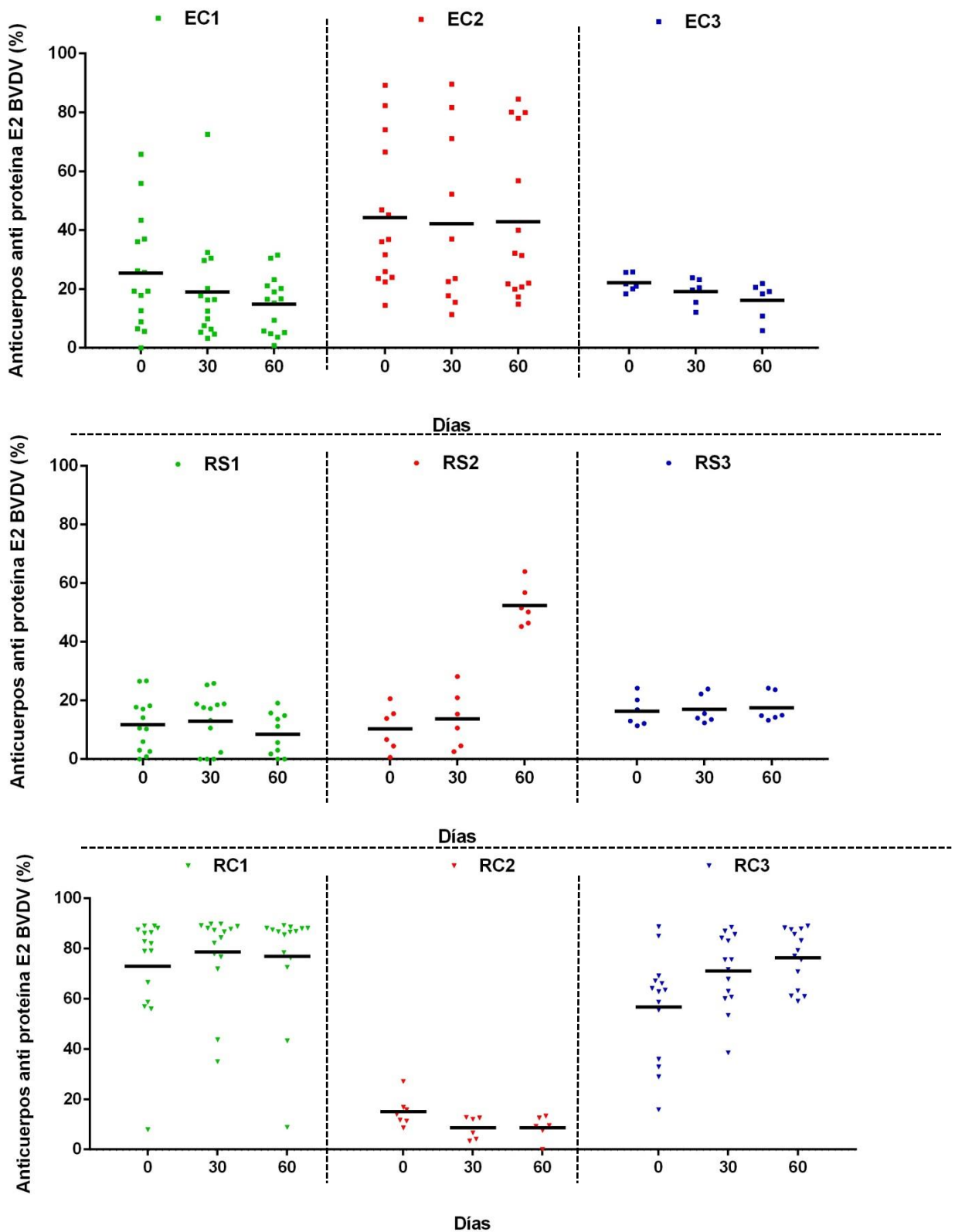
VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA					
Invernada	Fecha de muestreo	Prevalencia Serológica	Título Promedio Ac ± DE	IC (95%)	
				LI	LS
EC1	0	66,6	24,8 ± 19,9	13,9	35,8
	30	53,3	19 ± 17,7	9,2	28,8
	60	53,3	14,9 ± 9,7	9,5	20,3
EC2	0	92,9	44,2 ± 24,3	30,2	58,3
	30	72,7	44,2 ± 29,4	21,2	63,2
	60	92,9	42,8 ± 27	27,2	58,4
EC3	0	100	22,1 ± 3	18,9	25,3
	30	66,7	19,1 ± 4,5	14,4	23,9
	60	66,7	16,1 ± 6,3	9,5	22,8
RS1	0	38,5	11,8 ± 9,2	6,2	17,4
	30	53,8	11,2 ± 10,3	5,5	16,9
	60	10	8,2 ± 7,6	2,8	13,7
RS2	0	16,7	10,3 ± 7,6	2,4	18,3
	30	33,3	13,7 ± 9,8	3,4	24
	60	100	52,4 ± 7	45	59,8
RS3	0	50	16,3 ± 5,1	10,9	21,7
	30	33,3	16,9 ± 4,9	11,8	22,1
	60	33,3	17,6 ± 5	12,3	22,8
RC1	0	93,3	72,9 ± 21,7	60,9	85
	30	100	78,6 ± 16,9	69,4	87,9
	60	93,3	76,9 ± 22,4	64,7	89,3
RC2	0	28,6	15 ± 6	9,5	20,6
	30	0	8,6 ± 4,4	3,9	13,2
	60	0	8,3 ± 5,7	2,3	14,2
RC3	0	92,9	56,7 ± 21,1	44,6	68,9
	30	100	74,9 ± 14,7	62,6	79,5
	60	100	76,3 ± 11,4	69,8	82,9

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; Ac: Anticuerpos

DE: Desvío estándar

LI: Límite inferior; LS: Límite superior

**Figura 21:** Dinámica de anticuerpos totales para BVDV en las 9 invernadas bajo estudio.



Cada cuadrado, círculo y triángulo representa un individuo; EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio; 60: sesenta días post-inicio y — media aritmética. Las muestras de sueros se tomaron a los días 0, 30 y 60 del inicio de cada invernada y se evaluaron anticuerpos contra proteína E2 de BVDV mediante test de ELISA de competición. Los valores se expresan como porcentajes de anticuerpos detectados.



**Tabla 19:** Cantidad de animales que seroconvirtieron para BVDV entre las fechas de muestreo en las invernadas donde se detectaron animales seropositivos.

<b>Intervalo de tiempo</b>	<b>0-30</b>	<b>30-60</b>
<b>Invernada</b>		
<b>EC1</b>	0/15	0/15
<b>EC2</b>	2/11	1/11
<b>EC3</b>	0/6	0/6
<b>RS1</b>	0/13	0/10
<b>RS2</b>	1/6	5/6
<b>RS3</b>	0/6	0/6
<b>RC1</b>	3/15	0/15
<b>RC2</b>	0/6	0/5
<b>RC3</b>	7/10	0/10

EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación y RC: Recría a corral; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio y 60: sesenta días post-inicio.

#### - **Aislamiento BVDV**

No se obtuvieron aislamientos de BVDV biotipo citopático (CP) de secreciones nasales y/o oculares.

Se analizaron muestras de suero de animales sospechosos de presentar infección activa, debido a la presencia de seroconversión, y de animales sospechosos de ser persistentemente infectados (PI), debido a que en los 3 momentos de toma de muestras se mantuvieron negativos frente al resto de los animales que presentaron anticuerpos para BVDV. Todas las muestras resultaron negativas a la RT-PCR.

#### - **Discusión dinámica de circulación BVDV**

Los anticuerpos detectados por el ELISA utilizado en el presente trabajo, indican la presencia del genotipo Ia que es el prevalente en Patagonia (Perez Aguirreburualde, 2014a).

Las prevalencias a nivel de las invernadas para BVDV fueron del 66% en los 3 momentos de muestreo. Esto es inferior al 96,3% hallado por Perez Aguirreburualde *et al.* (2014b) en rodeos de cría del noroeste de Chubut y al 100% hallado por Reinhardt *et al.* (1990) en rodeos de cría y tambos de la región X de Chile, que limita geográficamente con el Valle 16 de Octubre.

La prevalencia a nivel animal fue del 66,8%. Estos hallazgos son similares a lo reportado por Perez Aguirreburualde (2014a) en rodeos de cría del noroeste del Chubut y por Streintemberger *et al.* (2017) en un campo de cría en la provincia de Buenos Aires para el genotipo Ia. También es similar a lo hallado por Rweywmamu *et al.* (1990) en la zona central y

noreste argentino, por Robles *et al.* (2015) en la provincia de Neuquén, por Odeón *et al.* (2001) en la provincia de Buenos Aires y por Guarino *et al.* (2008) en Uruguay, aunque en los últimos trabajos no se informa que genotipo viral reconocen los anticuerpos detectados ni la edad de los animales muestreados. A su vez fue superior al 25,6% hallado por Odeón *et al.* (2001) en animales de entre 6 y 12 meses de edad en Corrientes. Tal como sucedió con otros trabajos, en Odeón *et al.* (2001) no se aclara para que genotipo viral fueron los anticuerpos hallados, lo que podría explicar las diferencias encontradas. Esto se refuerza con el hecho de que en Argentina, hacia el norte del paralelo 42, el genotipo prevalente es el Ib (Pécora *et al.*, 2014), mientras que hacia el sur son el Ia y el II (Perez Aguirreburualde, 2014a). La prevalencia hallada en este trabajo, resultó a su vez inferior al 77,8% reportado por Reinhardt *et al.* (1990) para la X región de Chile. Estos hallazgos son indicativos de que en la zona de estudio hay infección activa de BVDV (Lertora, 2003; Perez Aguirreburualde, 2014a).

En 4 de las 9 invernadas, los anticuerpos detectados podrían ser de tipo calostrales ya que la cantidad de animales positivos disminuyó al igual que los títulos de anticuerpos. Esta hipótesis se sostiene en el hecho que al inicio de las tomas de muestra los terneros tenían entre 150 y 240 días de vida y, de acuerdo a Fulton *et al.* (2004) y Coria y McClurkin, (1978), el tiempo necesario para que los anticuerpos calostrales dejen de detectarse es de 190 días.

En otras 2 de las 9 invernadas se observaron seroconversiones y aumento en la cantidad de animales seropositivos. Estas invernadas son 2 de las 3 en las cuales se mezclaron animales de diferentes orígenes. En una, luego del inicio de la alimentación de la cohorte de terneros que formaron parte de este estudio, ingresaron más animales que fueron alojados en el mismo potrero donde estaban los antiguos. En la otra, los terneros fueron acondicionados durante 30 días antes al inicio de la alimentación. En la primera las seroconversiones se observaron entre los días 30 y 60, y en la segunda entre los días 0 y 30. Una de las principales fuentes de transmisión de BVDV son los animales persistentemente infectados (PI) (Wittum *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2005; Loneragan *et al.*, 2005; Houe *et al.*, 2006). Houe (1995) describe que ante prevalencias intra-rodeos que superan el 90%, aumentan las probabilidades de presencia de animales PI en los mismos. Moerman *et al.* (1993), a su vez, observó seroconversión en un lapso de 3 meses en el 100% de animales susceptibles que tuvieron contacto con un animal PI. Si bien en ninguna de estas dos invernadas ni en las 7 restantes se pudieron identificar animales PI, su presencia no puede descartarse si se tienen en cuenta la prevalencia previa reportada, tanto a nivel rodeo como a nivel animal, y el hallazgo previo de 2 animales PI (Perez Aguirreburualde 2014a y 2014b) en la zona de estudio. A esto se suma la baja prevalencia (0,3%) de animales PI que son detectados

al llegar a los engordes (Loneragan *et al.*, 2005 y Fulton *et al.*, 2006) y a que a su vez, en este estudio se trabajó solo sobre una muestra del total (23,8%) de los animales.

En 3 de las invernadas restantes se observaron situaciones particulares. En la primera los terneros tenían entre 240 y 300 días de vida, no se observaron seroconversiones y disminuyó la cantidad de animales positivos, por lo que no podrían ser anticuerpos calostrales y tampoco estar presente una infección activa. Brackenbury *et al.* (2003) describen prevalencias bajas pero constantes como resultado de la habilidad de BVDV de comportarse de manera endémica bajo determinadas condiciones epidemiológicas. Las condiciones que se observaron en esta invernada fueron que los terneros provenían de un mismo campo de origen y estuvieron 76 días en acondicionamiento. En la segunda invernada, los terneros tenían entre 180-210 días de vida, se observaron seroconversiones y la prevalencia intrarodeo se sostuvo cercana al 90%. Los hallazgos podrían deberse a circulación viral en presencia de anticuerpos calostrales, actuando estos últimos como inhibidores de la respuesta humoral ante la infección (Lertora, 2003). En la tercera invernada, los terneros tenían entre 210-270 días de vida, se observaron seroconversiones y la prevalencia intrarodeo se sostuvo cercana al 90%. Por la edad de los terneros, los títulos no corresponderían a anticuerpos calostrales. Los hallazgos podrían deberse a que se detectó la última etapa de circulación viral. En esta invernada los animales provenían de diferentes campos de cría y habían ingresado un mes antes del inicio de la toma de muestras. La persistencia de niveles elevados de anticuerpos junto a la elevada prevalencia en los tres momentos de toma de muestras podría estar indicando evidencia de animales PI (Houe *et al.*, 1995; Lertora 2003, Travería *et al.*, 2011; Fulton *et al.*, 2005).

La circulación de BVDV estuvo asociada a la mezcla de animales de diferentes orígenes (OR=23; IC95%=6,09-86,92; p=0,00001), que se relacionaría con la probabilidad de la presencia de animales PI en un momento de desprotección de la inmunidad calostrale (OConnor *et al.*, 2005; Fulton *et al.*, 2006; Travería *et al.*, 2011;).

No se obtuvieron aislamientos de BVDV. Por un lado, esto pudo deberse a que la técnica de aislamiento viral tiene una sensibilidad del 83%, por lo cual es posible que algunos de los resultados sean falsos negativos (Houe *et al.*, 2006; Marini *et al.*, 2012). Además, las muestras de buffy coat serían las de preferencia para el aislamiento de este virus y no las secreciones (Fulton *et al.*, 2005). Por otro lado pudo deberse a que la técnica de aislamiento viral en este trabajo se utilizó como screening, a partir del cual sólo aquellos cultivos con efecto citopático fueron sometidos a pruebas confirmatorias de los virus actuantes. Por lo tanto, la metodología empleada en este trabajo sólo permitió identificar al biotipo citopático (CP) de BVDV (Odeón *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayoría de los aislamientos en el ganado bovino en diferentes lugares del

mundo son del biotipo no citopático (NCP) (OIE, 2018; Fulton *et al.*, 2000a; Odeón *et al.*, 1999; Pecora *et al.*, 2014). A su vez, y como a partir del estudio de la dinámica de anticuerpos para BVDV se podría confirmar la presencia de animales PI durante este trabajo, es de esperar que el biotipo circulante fuera NCP (OIE, 2018; Odeón *et al.*, 1999). A partir de la RT-PCR de las muestras de suero tampoco se pudo detectar la presencia del genoma viral.

- **Co-infecciones**

En las 9 invernadas circuló al menos uno de los virus estudiados (Tabla 20).

- En 5 invernadas se observó circulación de un solo virus. De estas, en el 80% circuló BPI3V y en el 20% restante BVDV. La circulación de BoHV1 en las invernadas siempre ocurrió en presencia de otro de los agentes virales en estudio.
- En 3 de las invernadas se observó circulación de 2 virus. De estas, en el 67% lo hicieron BPI3V y BVDV y en el 33% restante lo hicieron BoHV1 y BPI3V.
- En la invernada restante circularon los tres virus.

**Tabla 20:** Infecciones por uno o más virus involucrados en el CRB en las 9 invernadas bajo estudio.

Invernada	BoHV1	BPI3V	BVDV
EC1		X	
EC2	X	X	X
EC3		X	
RS1	X	X	
RS2		X	X
RS3		X	
RC1			X
RC2		X	
RC3		X	X

EC: Engorde a corral; RS: Recría con suplementación; RC: Recría a corral; BoHV1: Herpes virus bovino tipo 1; BPI3V: Virus de parainfluenza bovina 3; BVDV: Virus de la diarrea viral bovina.

A nivel individual, en el 52% (65/125) de los terneros de la cohorte con datos de serología en los 3 momentos de muestreo, se observaron indicadores de infección viral. De los 65 animales infectados, 10 (15,4%) presentaron infecciones con dos virus. De estos 10 animales

con infecciones conjuntas, en 3 casos se detectaron BPI3V y BoHV1 y en 7 BPI3V y BVDV. En ningún animal se identificaron infecciones que involucraran a los tres virus en estudio.

- **Discusión co-infecciones**

En todas las invernadas se observaron indicadores de circulación viral, como seroconversión y/o aislamiento, de al menos uno de los virus en estudio. Así mismo, en el 44% se observó circulación de más de un virus, lo que indicaría la ocurrencia de co-infecciones.

A nivel animal, se observó un 15,4% de co-infecciones lo cual es inferior a lo hallado por Fulton *et al.* (2000b) y Streintenberger *et al.* (2017). Las diferencias se deberían a que en ambos trabajos, en el 77,7% y el 60% de las infecciones conjuntas, respectivamente, estuvieron involucrados, aparte de los virus estudiados en este trabajo, BVDV genotipo II y BRSV, virus que en el presente trabajo no se evaluaron.

## **Capítulo 2:**

### **Casos clínicos**

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

## Materiales y Métodos

En las visitas que se realizaron de rutina a las 9 invernadas (cada 15 días los 2 primeros meses y luego una visita a los 30 días de terminada la última toma de muestra), se detectaron 3 brotes de CRB y un brote de Queratoconjuntivitis. La población en riesgo de este estudio estuvo constituida por el total de los animales de cada invernada (Tabla 3, Materiales y Métodos: Generalidades).

Se obtuvieron muestras de sangre y secreciones de mucosa nasal/ocular de los animales identificados como casos clínicos de (ccCRB) y/o casos clínicos de queratoconjuntivitis (ccQ) y de un número igual de animales calificados como controles sanos de CRB (coCRB) y/o controles sanos de queratoconjuntivitis (coQ) (Por detalles ver: Generalidades Materiales y Métodos).

El sangrado y la recolección de muestras de secreciones tanto en los casos como en los controles se realizaron en los momentos de presentación clínica de la enfermedad y se repitió el sangrado entre 14 y 27 días posteriores a la primera toma de muestras.

Debido al limitado número de muestras, la independencia entre las variables presencia de casos clínicos de CRB y/o queratoconjuntivitis y la presencia de infección viral a partir de indicadores de seroconversión y/o aislamientos, se analizaron con la prueba exacta de Fisher. Se utilizó el programa Microsoft Excel<sup>®</sup> (2010). Valores  $p < 0,05$  indican falta de independencia entre las variables.

### - Definición de caso clínico y de control sano de CRB

Para la calificación de un caso clínico de CRB se otorgó un punto por cada uno de los 5 signos clínicos observados (Allen *et al.*, 1991):

- depresión
- anorexia
- descarga nasal copiosa
- frecuencia respiratoria superior a 40 respiraciones por minuto
- presencia de tos espontánea detectada más de una vez durante 10 minutos

Animales con puntaje clínico igual o mayor a 4 fueron considerados ccCRB. A los animales un puntaje entre 2 y 3, se les tomó la temperatura rectal como signo adicional, si la temperatura fue de 40°C o superior, se lo consideró caso clínico (Allen *et al.*, 1991)

Se calificaron como controles sanos para CRB a aquellos animales sin signos o con puntaje 1. También se incluyeron como controles sanos a aquellos animales con puntaje 2 o 3 que no presentaron temperatura rectal superior a los 40°C.

### - **Definición de caso clínico y de control sano de queratoconjuntivitis**

Para la calificación de un caso clínico de queratoconjuntivitis se tuvo en cuenta la presencia y el grado de lesiones oculares, otorgándoles la siguiente puntuación (Zbrun *et al.*, 2011):

0= sano sin lesiones

1= epifora y/o conjuntivitis

2= Erosión corneal

3= Úlcera corneal

4= Membranas internas prolapsadas (queratocono) con pérdida de sustancia ocular

Se calificaron como casos clínicos de queratoconjuntivitis a los animales con puntaje igual o mayor que 1. Como controles sanos de queratoconjuntivitis se tomaron animales con puntaje cero.

### **Resultados**

Se observaron casos clínicos en 3 invernadas. En RS1 se observó un brote de queratoconjuntivitis y posteriormente uno de CRB. En las invernadas EC2 y RC2 se presentaron casos de CRB.

- **Engorde a corral 2 (EC2)**

Se observaron signos clínicos de CRB 63 días posteriores al inicio de la invernada. Los signos detectados fueron descarga nasal copiosa y tos más de una vez durante el tiempo de observación. Se seleccionaron 3 casos clínicos, con puntaje 2 y temperatura rectal de 40°C. Se seleccionó un solo animal sin signos como control sano debido a que no se contaba con el medio de transporte para las muestras en el momento de la detección del cuadro. Los casos clínicos y el control sano se remuestrearon a los 15 días de detectado el cuadro (Tabla 21).

- No se obtuvieron aislamientos de BoHV1. Los 4 animales se mantuvieron seronegativos.
- No se obtuvieron aislamientos de BPI3V. Los 4 animales resultaron seropositivos y en ambos momentos los títulos de anticuerpos fueron de 2,8 para todos los animales.
- Para BVDV no se obtuvieron aislamientos de tipo citopático y no se detectó genoma viral en suero. Los 4 animales resultaron seropositivos en ambos momentos aunque no se observó seroconversión.



**Tabla 21:** Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Engorde a corral 2.

ID	Fecha Muestreo	BoHV1			BPI3V			BVDV		% Ac
		Aislamiento		Ac	Aislamiento		Ac	Aislamiento-RT-PCR		
		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo	
ccCRB1 (105)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	22
	15	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	36
ccCRB2 (114)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	22
	15	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	33
ccCRB3 (125)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	87
	15	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	87
coCRB (153)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	23
	15	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	22

ID: Identificación e individualización de los casos clínicos y de los controles sanos; ccCRB: caso clínico de Complejo Respiratorio Bovino; coCRB: control sano de Complejo Respiratorio Bovino; Neg: Negativo; Ac: títulos de anticuerpos expresados como  $\text{Log}_{10}$  de la máxima dilución donde se detectaron anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V mediante test de ELISA indirecto; %Ac: porcentaje de anticuerpos para BVDV detectados mediante test de ELISA de competición 0: inicio del brote, 15: 15 días posteriores al inicio del brote; -: sin muestra.

- **Recría con suplementación 1 (RS1)**

Se presentaron dos eventos, un brote de queratoconjuntivitis y un brote de CRB.

El brote de queratoconjuntivitis se observó 28 días posteriores al inicio de la invernada. Se identificaron 4 animales como casos clínicos de queratoconjuntivitis que presentaron puntaje 1. Se seleccionaron 4 animales con puntaje 0 como controles sanos de queratoconjuntivitis. Los casos clínicos y los controles sanos se remuestrearon a los 14 días de detectado el cuadro (Tabla 22).

- Se obtuvieron 5 aislamientos de BoHV1 de los 4 casos clínicos. Tres de los animales de los cuales se aisló el virus seroconvirtieron. Se obtuvieron cuatro aislamientos a partir de secreciones oculares (uno por cada ccQ) y uno de secreciones nasales (ccQ1). De los 4 animales controles sanos se obtuvo de uno de ellos un aislamiento de BoHV1 a partir de secreciones nasales. No se observó seroconversión en ninguno de los animales controles sanos.
- No se obtuvieron aislamientos de BPI3V de los casos clínicos y un animal (ccQ3) seroconvirtió. Se obtuvo un aislamiento de BPI3V a partir de secreciones nasales de un control sano. No se observó seroconversión en ninguno de los animales controles sanos.

- Para BVDV no se obtuvieron aislamientos de tipo citopático y no se detectó genoma viral en suero tanto en los casos clínicos como en los controles sanos. No se observó seroconversión en ningún animal.

**Tabla 22:** Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de queratoconjuntivitis en la invernada identificada como Recría con suplementación 1.

ID	Fecha Muestreo	BoHV1			BPI3V			BVDV		% Ac
		Aislamiento		Ac	Aislamiento		Ac	Aislamiento-RT-PCR		
		Pos/ Neg	Tipo		Pos/ Neg	Tipo		Pos/ Neg	Tipo	
ccQ 1 (491)	0	Pos	N-O	Neg*	Neg	-	2,8	Neg	-	18
	14	-	-	1,6*	-	-	3,4	-	-	Neg
ccQ2 (507)	0	Pos	O	Neg*	Neg	-	3,4	Neg	-	Neg
	14	-	-	1,6*	-	-	3,4	-	-	Neg
ccQ3 (508)	0	Pos	O	Neg*	Neg	-	2,2*	Neg	-	Neg
	14	-	-	1,6*	-	-	3,4*	-	-	Neg
ccQ4 (490)	0	Pos	O	1,6	Neg	-	3,4	Neg	-	18
	14	-	-	2,2	-	-	3,4	-	-	Neg
coQ1 (483)	0	Neg	-	2,8	Neg	-	3,4	Neg	-	19
	14	-	-	2,8	-	-	3,4	-	-	Neg
coQ2 (485)	0	Pos	N	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	25
	14	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	21
coQ3 (487)	0	Neg	-	1,6	Pos	N	2,8	Neg	-	26
	14	-	-	1,6	-	-	3,4	-	-	19
coQ4 (484)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	17
	14	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	Neg

ID: Identificación e individualización de los casos clínicos y de los controles sanos; ccQ: caso clínico queratoconjuntivitis; coQ: control sano de queratoconjuntivitis; Neg: Negativo, Pos: positivo; Ac: títulos de anticuerpos expresados como  $\text{Log}_{10}$  de la máxima dilución donde se detectaron anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V mediante test de ELISA indirecto; %Ac: porcentaje de anticuerpos para BVDV detectados mediante test de ELISA de competición; 0: Inicio del brote, 14: 14 días posteriores al inicio del brote; -: sin muestra; N: de secreción nasal; O: de secreción ocular; \*Incremento en el título de anticuerpos indicativo de seroconversión

El brote de CRB en esta misma invernada se inició 70 días posteriores al inicio de la alimentación. Debido a cuestiones operativas se pudo realizar la toma de muestras de suero y secreciones luego de 21 días de iniciado el brote. Se identificaron 3 casos clínicos con puntaje 3 debido a la presencia de descarga nasal (Figura 22), tos que se detectó más de una vez durante el

tiempo de observación y frecuencia respiratoria >40 por minuto post encierre. Estos animales se consideraron casos clínicos debido a que la temperatura rectal fue de 40°C. Simultáneamente se tomaron muestras de 3 animales sin síntomas que actuaron como controles sanos. Los casos clínicos y los controles sanos se remuestrearon a los 17 días de detectado el cuadro (Tabla 23).

- No se obtuvieron aislamientos de BoHV1. Un control sano seroconvirtió (coCRB2)
- No se obtuvieron aislamientos de BPI3V. No se observó seroconversión.
- No se obtuvieron aislamientos de BVDV de tipo citopático y no se detectó genoma viral en suero tanto de casos clínicos como de controles sanos. No se observó seroconversión

**Tabla 23:** Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Recría con suplementación 1.

ID	Fecha Muestreo	BoHV1			BPI3V			BVDV		% Ac
		Aislamiento		Ac	Aislamiento		Ac	Aislamiento-RT-PCR		
		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo	
ccCRB1 (485)	0	Neg		Neg	Neg		3,4	Neg		20
	17	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	17
ccCRB2 (507)	0	Neg		1,6	Neg		3,4	Neg		Neg
	17	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	Neg
ccCRB3 (469)	0	Neg		1,6	Neg		3,4	Neg		Neg
	17	-	-	1,6	-	-	3,4	-	-	Neg
coCRB1 (483)	0	Neg		2,8	Neg		3,4	Neg		20
	17	-	-	1,6	-	-	3,4	-	-	Neg
coCRB2 (487)	0	Neg		0*	Neg		2,8	Neg		17
	17	-	-	1,6*	-	-	2,8	-	-	Neg
coCRB3 (498)	0	Neg		Neg	Neg		3,4	Neg		19
	17	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	Neg

ID: Identificación e individualización de los casos clínicos y de los controles sanos, ccCRB: caso clínico de Complejo Respiratorio Bovino; coCRB: control sano de Complejo Respiratorio Bovino; Neg: Negativo; Ac: títulos de anticuerpos expresados como Log<sub>10</sub> de la máxima dilución donde se detectaron anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V mediante test de ELISA indirecto; %Ac: porcentaje de anticuerpos para BVDV detectados mediante test de ELISA de competición; 0: inicio del brote; 17: 17 días posteriores al inicio del brote; -: sin muestra; N: de secreción nasal; O: de secreción ocular; \*Incremento en el título de anticuerpos indicativo de seroconversión.

**Figura 22:** Animal clasificado como caso clínico de CRB (ccCRB2) en RS1. Nótese la abundante descarga por fosas nasales de un líquido filante y transparente.



- **Recría a corral 2 (RC2)**

En RC2 se observaron casos clínicos de CRB al inicio de la alimentación. Se seleccionaron tres animales que presentaban puntaje 2 por la presencia de descarga nasal de tipo mucosa (Figura 23) y tos detectada más de una vez durante el tiempo de observación. Estos animales se consideraron casos clínicos debido a que la temperatura rectal fue de 40°C. Se seleccionaron 3 animales sin signos clínicos como controles sanos. Los casos clínicos y los controles sanos se remuestrearon a los 27 días de detectado el cuadro (Tabla 24).

- No se obtuvieron aislamientos de BoHV1 ni se observó seroconversión.
- No se obtuvieron aislamientos de BPI3V. Se detectó seroconversión en un animal considerado como caso clínico (ccCRB2). No se observó seroconversión en los controles sanos.
- Para BVDV no se obtuvieron aislamientos de tipo citopático y no se detectó genoma viral en suero tanto de casos clínicos como de controles sanos. No se observó seroconversión.

**Tabla 24:** Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Recría a corral 2.

ID	Fecha Muestreo	BoHV1			BPI3V			BVDV		% Ac
		Aislamiento		Ac	Aislamiento		Ac	Aislamiento – RT-PCR		
		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo		Pos/Neg	Tipo	
ccCRB1 (812)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	3,4	Neg	-	27
	27	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	Neg
ccCRB2 (844)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	1,6*	Neg	-	Neg
	27	-	-	Neg	-	-	3,4*	-	-	Neg
ccCRB3 (863)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	Neg
	27	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	Neg
coCRB1 (816)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	Neg
	27	-	-	Neg	-	-	3,4	-	-	Neg
coCRB2 (822)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	2,8	Neg	-	17
	27	-	-	Neg	-	-	2,2	-	-	Neg
coCRB3 (854)	0	Neg	-	Neg	Neg	-	3,4	Neg	-	s/d
	27	-	-	Neg	-	-	2,8	-	-	s/d

ID: Identificación e individualización de los casos clínicos y de los controles sanos; ccCRB: caso clínico de Complejo Respiratorio Bovino; coCRB: control sano de Complejo Respiratorio Bovino; Neg: Negativo; Ac: títulos de anticuerpos expresados como  $\log_{10}$  de la máxima dilución donde se detectaron anticuerpos totales para BoHV1 y BPI3V mediante test de ELISA indirecto; %Ac: porcentaje de anticuerpos para BVDV detectados mediante test de ELISA de competición; 0: inicio del brote; 27: 27 días posteriores al inicio del brote; -: sin muestra; N: de secreción nasal; O: de secreción ocular; s/d: Sin datos; \*Incremento en el título de anticuerpos indicativo de seroconversión.

**Figura 23:** Secreción nasal mucosa en caso clínico de CRB en Recría a corral (RC2)



## Discusión

Se observaron casos clínicos de CRB en 3 de las 9 de las invernadas. El puntaje clínico promedio fue de 2,3 y los signos observados fueron descarga nasal, tos y aumento en la frecuencia respiratoria. Este hallazgo es diferente al de Allen *et al.* (1991) tanto en el puntaje clínico promedio de 3, como en los signos observados (depresión, anorexia y aumento de la frecuencia respiratoria). Las diferencias podrían deberse a las diferentes metodologías aplicadas. Por un lado, los signos identificados en el presente trabajo fueron aquellos evidentes de una afección en el sistema respiratorio, quizás porque su presencia resultó evidente y además específica, mientras que en Allen *et al.* (1991) se detectaron signos comunes a otras enfermedades, poco evidentes y poco específicos (Buczinski *et al.*, 2015 y Winter y Renter, 2009). Por el otro lado, mientras que Allen *et al.* (1991) observaron a los animales dos veces al día, en el presente trabajo los animales se observaron con una frecuencia quincenal y/o cuando la persona encargada de la invernada notaba alguno de los signos respiratorios.

Los casos de CRB se presentaron a los 63 (EC2), 70 (RS1) y 0 (RC2) días de comenzada la alimentación de los animales. Esto resulta diferente a lo observado por Babcock *et al.* (2009) y Thomson *et al.* (2006) donde la mayoría de los casos de CRB tuvieron lugar entre los primeros 35 a 42 días respectivamente, con el punto máximo a los 14 días.

En este trabajo en 4 de las 9 invernadas los animales fueron acondicionados por períodos de entre 30 y 76 días previos al inicio de la alimentación. Para Duff y Galyean (2007) y Step *et al.* (2008) el acondicionamiento de los animales disminuye la incidencia de casos de CRB, sin embargo en 2 de las 4 invernadas que acondicionaron los animales se presentaron casos de CRB. En una el acondicionamiento podría haber actuado como un factor de protección que desplazó el tiempo de ocurrencia de casos de CRB a los 70 días, sin embargo en la otra los casos se dieron al momento de finalizado el acondicionamiento. En la invernada restante con casos de CRB los animales no se acondicionaron y los casos se observaron a los 63 días de iniciada la alimentación. De esto se concluye que el acondicionamiento tal como se explicó en el Capítulo 1, no fue determinante de los casos clínicos, por lo que vuelve a remarcarse el componente climático como posible factor de riesgo para la ocurrencia de casos clínicos de CRB.

No se observó que BoHV1 haya estado asociado a los casos de CRB ( $p=0,6429$ ). Para Martín *et al.* (1989), la no contribución de BoHV1 en los casos de CRB puede deberse a la baja presencia del virus. Es notable sin embargo, que 2 de las invernadas donde se detectaron casos clínicos de CRB fueron las únicas durante el estudio de cohorte que presentaron evidencia de circulación de BoHV1, ya sea por serología y/o aislamientos, y entre 10 y 63 días previos a la

detección de los casos. Para Babiuk *et al.* (1996) la presencia de inmunidad humoral previa, ya sea por infección natural o por vacunación, actuaría en la prevención y eliminación de la infección.

En una invernada se observó seroconversión para BoHV1 en un animal calificado como control. Esto quizás se debió a la posibilidad de que el CRB se presente de manera subclínica (Allen *et al.*, 1992), de manera que el ternero pudo haber sido erróneamente calificado como control. Otra posibilidad, teniendo en cuenta que los anticuerpos para BoHV1 son detectables a partir del día 10 post infección (Engels y Ackerman, 1996), es que el ternero se haya infectado, durante el período de 17 días comprendido entre las tomas de muestras (Van Donkersgoed *et al.*, 1993).

No se observó asociación entre BPI3V y los casos de CRB ( $p=1$ ). La falta de evidencia es similar al hallazgo de Thomson *et al.* (1969; 1975), Fulton *et al.* (2002) y Tomlinson *et al.*, (2017) pero difiere con Stott *et al.* (1980), Martín y Bohac (1986) y Juárez Barranco *et al.* (2003). En las 3 invernadas los títulos se sostuvieron elevados entre los dos momentos de toma de muestra en torno a la detección de los casos clínicos. En 2 invernadas se observó, durante el estudio de cohorte, evidencia de circulación por serología y/o aislamiento de BPI3V entre 33 y 70 días previos a la ocurrencia de casos clínicos de CRB. La posibilidad de infección por BPI3V en ausencia de signos clínicos fue previamente reportada por Stott *et al.* (1980) y Carriere *et al.* (1983). En la invernada restante, durante el estudio de cohorte, se observó circulación viral en coincidencia con el momento de ocurrencia de los casos clínicos de CRB, observándose en los animales que formaron parte del estudio de casos y controles, sólo títulos de anticuerpos elevados. La falta de evidencia del rol de BPI3V en los casos clínicos de CRB podría deberse a la preexistencia de títulos elevados que podría haber enmascarado su circulación (Von Donkersgoed *et al.*, 1991).

No se observó asociación entre BVDV y los casos de CRB. Por un lado, esto es diferente al marcado aumento de títulos de anticuerpos para BVDV observado por Yates *et al.* (1983), Martín y Bohac (1986) y Fulton *et al.* (2002) en casos clínicos de CRB. Por otro lado, estos resultados son coincidentes con Booker *et al.* (1999), quienes describen la ausencia de seroconversión para BVDV en casos de CRB. Durante el estudio de cohorte, en una de las 3 invernadas con casos de CRB, se observaron seroconversiones a nivel individual para BVDV en todos los momentos previos a la ocurrencia de casos clínicos. En la misma se hipotetizó sobre la posible infección por este virus, pero cuyo reflejo a nivel serológico quedó enmascarado por la presencia de anticuerpos calostrales. Así mismo, O'Coonor *et al.* (2005) plantean que en terneros de un solo campo de origen, la exposición al virus de BVDV, ya sea por infección aguda o

presencia de animales PI genera una respuesta inmune competente con efecto protector. Esta situación de protección podría haber tenido lugar en la invernada analizada.

La falta de asociación entre la ocurrencia de casos clínicos de CRB y la circulación de BoHV1, BPI3V y/o BVDV, pudo deberse, tal lo planteado por Von Donkersgoed *et al.* (1993) y Tomlinson *et al.*, (2017):

- A la naturaleza multifactorial de la enfermedad,
- Al método subjetivo de clasificación de casos clínicos y controles,
- A la presencia de enfermedad subclínica,
- A un tamaño de muestra pequeño,
- A que las muestras de secreciones nasales y oculares no son las de preferencia para aislamiento de BoHV1, BPI3V y BVDV en casos de CRB.

En relación al cuadro de queratoconjuntivitis, este tuvo lugar a los 28 días de comenzada la alimentación. Esto coincide con Zbrun *et al.* (2011) que observaron en terneros de entre 8 y 11 meses de edad lesiones oculares a los 30 días del encierre. La puntuación otorgada a los animales con signos fue de 1 ya que presentaban epifora.

Se determinó que BoHV1 estuvo involucrado en el cuadro clínico de queratoconjuntivitis ( $p=0,0031$ ). Este constituye el primer trabajo que se tenga conocimiento, en que se pudo relacionar el rol de BoHV1 con casos clínicos naturales de queratoconjuntivitis. En un estudio previo sobre cuadros de queratoconjuntivitis, Zbrun *et al.* (2011) no observaron seroconversión para BoHV1 y tampoco aislaron BoHV1 tanto de los casos clínicos como de animales sanos. El trabajo de Zbrun *et al.* (2011) fue de tipo de cohorte y las muestras de suero y secreciones oculares se tomaron a tiempo fijo cada 30 días. Tomlinson *et al.* (2017) plantean que la toma de muestra para aislamiento viral debe ser en la etapa temprana de la enfermedad. Si se tiene en cuenta que el virus es excretado hasta 12-14 días post infección (Yates 1982; Pastoret *et al.*, 1986), es posible que el aislamiento negativo se deba al momento de toma de muestra. En otro estudio similar, pero en el que se trabajó con casos y controles de queratoconjuntivitis, Cardozo *et al.* (2008) tomaron muestras de suero y secreciones de animales con y sin signos al momento de detectar las lesiones oculares y luego a los 20 días. En este estudio tampoco aislaron BoHV1, probablemente porque las muestras de secreciones se tomaron de una submuestra de los animales detectados como casos clínicos. Apóstolo *et al.* (2017) observaron en casos de conjuntivitis mucopurulenta, la presencia de BoHV1 aunque no se pudo comprobar el rol del virus en la presentación clínica.



También se aisló BoHV1, durante los casos de queratoconjuntivitis, de un control sano que no seroconvirtió. Es posible que no se hayan identificado los signos clínicos y que por lo tanto se trate de un falso negativo. La falta de seroconversión, pudo deberse a que el período entre las tomas de muestras fue de 14 días. Martín *et al.*, (1968) informaron sobre la ausencia de seroconversión en terneros hasta 18 días después de una inoculación intranasal con títulos elevados de BoHV1.

# **Capítulo 3:**

## **Evaluación esquemas de vacunación**

**Materiales y Métodos**  
**Resultados**  
**Discusión**

- **Vacunas evaluadas**

- Vacuna experimental**

Se elaboró una vacuna inactivada contra BoHV1 y BPI3V. La misma se realizó a partir de un aislamiento de BoHV1 obtenido de secreciones oculares de un ternero con signos de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (Apóstolo *et al.*, 2017) y de un aislamiento de BPI3V de secreciones oculares obtenido de un animal asintomático (Apóstolo *et al.*, 2016). Ambos virus se obtuvieron en el año 2013 en la invernada identificada como Recría con suplementación 1 en los capítulos anteriores. En este mismo establecimiento durante el año 2016 se llevó a cabo la evaluación de esquemas de vacunación.

### **Virus**

Los stock virales para la vacuna se obtuvieron mediante la amplificación de un 4° pasaje de los virus conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las suspensiones virales se descongelaron a temperatura ambiente. Se inoculó 1 ml de suspensión de cada virus de manera individual sobre monocapas de células MDBK adheridas con un 90% de confluencia en botellas de cultivo de 170 ml (JETBIOFIL<sup>®</sup>) y con 60 ml de medio MEM-E suplementado con 2% de SFB. Los inóculos se incubaron por 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Titulación Viral**

La cuantificación de los virus se realizó por titulación a punto final. Se infectaron células MDBK, con 80-90% de confluencia, adheridas en placas de 96 pocillos (JETBIOFIL<sup>®</sup>) con diluciones sobre base 10 de las suspensiones virales amplificadas. Las diluciones del stock viral fueron sembradas por cuadruplicado y las placas se incubaron durante 1 hora  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego se reemplazó el inóculo viral con medio MEM-E suplementado con 2% de SFB y se incubó por 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se observaron diariamente en microscopio óptico invertido para identificar la presencia de efecto citopático (Ladelfa, 2010). Los títulos virales fueron calculados por el método de Reed y Muench (1938) y fueron expresados en Dosis Infecciosa de Cultivo Celular 50 (DICC<sub>50</sub>) que se definió como la dilución de la suspensión viral necesaria para infectar el 50% de un determinado número de cultivos celulares. Para BoHV1 se alcanzó un título de  $10^6$  DICC<sub>50</sub> en el 7° pasaje y BPI3V un título de  $10^{7.3}$  DICC<sub>50</sub> en el 6° pasaje (Anexo III).

### **Inactivación**

Cuarenta y cinco mililitros de suspensión de cada virus se inactivaron por separado con 450 µl (1%) de etilenimina binaria (BEI) 0,1M (Bahnemann, 1990) (Anexo III). La inactivación se realizó en estufa a 37°C durante 25 horas en agitación constante. Pasado ese tiempo se neutralizó la suspensión viral inactivada con 450 µl (1%) de tiosulfato de sodio 1M (Anexo III), que se agregó mientras se agitaba manualmente. Luego se incubó a 37°C durante 10-15 minutos en agitación. Pasado ese tiempo las soluciones se mantuvieron a 4°C.

El control de inactivación se hizo sobre monocapas de células MDBK crecidas en placas de cultivo celular de 96 pocillos (JETBIOFIL<sup>®</sup>) con medio MEM suplementado con 10% de SFB. Cuando la confluencia de las células fue del 90%, se eliminó el medio de crecimiento y se colocaron 90 µl por pocillo de medio MEM-E suplementado con 2% de SFB. Se sembraron por cuadruplicado las diluciones seriadas en base 10 de las suspensiones inactivadas hasta una concentración de 10<sup>-10</sup>. Como controles se dejaron monocapas celulares sin inocular. La placa se incubó durante 3 días a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. No se observó efecto citopático en ninguna dilución lo cual demostró que el procedimiento para la inactivación viral fue adecuado. Se alicuotó 1 ml de suspensión viral inactivada y se conservó a -80°C.

### **Formulación**

Se mezclaron 44 ml de cada suspensión viral inactivada y se agregaron 573 µl de timerosal al 1%. Para el cálculo de ese volumen se trabajó en una dilución 1:32500 de timerosal sobre el volumen final esperado de vacuna que se calculó en 176 ml.

La solución de suspensiones virales se mezcló con 88 ml de adyuvante oleoso mineral (Biogénesis Bagó), se agito y luego se homogeneizó con una mezcladora de mano ultraturrax<sup>®</sup> T25 (IKA<sup>®</sup>, Alemania) durante 8 minutos. Una vez cumplido el tiempo, la vacuna quedó formulada alcanzando el volumen total de 176 ml. Se conservaron alícuotas de 1 ml de la vacuna formulada. El volumen restante se fraccionó en 4 frascos estériles según la cantidad de dosis a utilizarse en los ensayos con cobayos (0,6 ml/dosis) y bovinos (3 ml/dosis).

Todos los frascos se mantuvieron entre 4 y 8°C durante su almacenamiento y transporte.

### **-Vacuna Comercial**

Se utilizó una vacuna oleosa Biopoligen<sup>®</sup> AIR (Biogénesis Bago) compuesta por BoHV tipos 1 y 5, BPI3V, BVDV tipo 1 y 2 y BRSV inactivados con BEI. Además la formulación incluyó *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* inactivadas con formaldehído.

## • Prueba de Potencia en Cobayos

Para determinar si la vacuna experimental contaba con la inmunogenicidad mínima requerida para inducir una respuesta humoral específica en bovinos, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* en cobayos (Parreño *et al.*, 2010b). El mismo ensayo se utilizó para evaluar la vacuna comercial.

### **Materiales y Métodos**

Se utilizaron 15 cobayos (*Cavia porcellus*) mayores de 30 días de edad y de  $400 \pm 50$  gramos de peso. Cinco cobayos se inmunizaron con la vacuna experimental y cinco se inmunizaron con la vacuna comercial. A ambos grupos se le aplicaron 2 dosis de 0,6 ml vía subcutánea separadas por 21 días. Como grupo control se utilizaron 5 cobayos sin vacunar.

Los cobayos son una especie libre de BoHV1 y BPI3V y, por lo tanto, son naturalmente seronegativos contra ambos agentes virales. Se tomaron muestras de sangre de los 15 animales a los 30 y 60 días posteriores a la primera dosis de vacuna a fin de determinar la cinética de anticuerpos totales.

Los títulos de anticuerpos se determinaron para ambos virus mediante dos ELISA indirectos similares a los descritos en Materiales y Métodos: Generalidades. Para este ensayo, se utilizó un anticuerpo purificado de cabra, anti-cobayo (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL) conjugado con peroxidasa en una dilución de trabajo de 1:4000 (Parreño *et al.*, 2010b; Romera *et al.*, 2017).

La comparación entre las medias geométricas de los títulos de anticuerpos alcanzados por la vacuna experimental y la vacuna comercial se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el programa INFOSTAT<sup>®</sup>. Valores  $p < 0,05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.

A partir de la prueba de potencia en cobayos, las vacunas se clasificaron en tres categorías (Anexo III) en función a la respuesta inmune humoral que indujeron:

- No satisfactoria
- Satisfactoria
- Muy satisfactoria

### Resultados Prueba de Potencia en Cobayos

Los resultados obtenidos en la prueba de potencia en cobayos se observan en la Tabla 25. Para ambos virus, se observan diferencias significativas entre ambas vacunas al día 30 ( $p < 0,05$ ), siendo mayores los títulos alcanzados con la vacuna experimental. Estas diferencias no se observaron al día 60 ( $p > 0,05$ ) (Tabla 25).

Para BoHV1 tanto la vacuna experimental como la comercial resultaron satisfactorias (Figura 24). Para BPI3V tanto la vacuna experimental como la comercial resultaron muy satisfactorias (Figura 25).

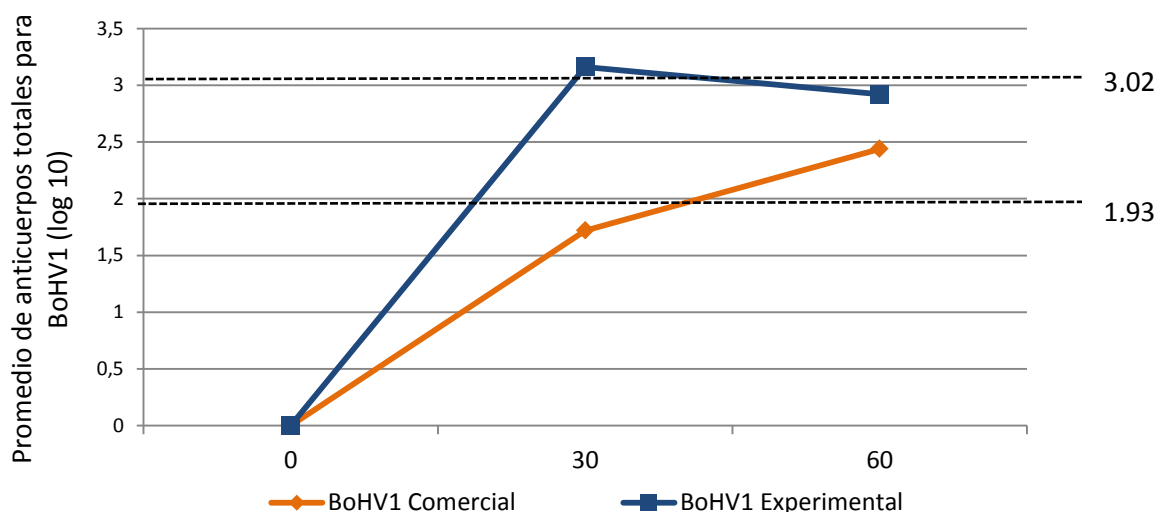
Los 5 animales controles resultaron negativos a la serología para ambos virus en las 2 fechas de muestreo.

**Tabla 25:** Título de anticuerpos totales en cobayos vacunados con vacuna experimental y comercial en dos momentos.

Virus	BoHV1				BPI3V			
	Día	Día 30		Día 60		Día 30		Día 60
Vacuna	Exp	Com	Exp	Com	Exp	Com	Exp	Com
<b>Cobayo 1</b>	3,4	1,6	3,4	2,8	3,4	0	3,4	2,8
<b>Cobayo 2</b>	3,4	1,6	3,4	2,2	3,4	0	3,4	2,2
<b>Cobayo 3</b>	3,4	2,2	3,4	2,8	3,4	2,2	3,4	2,2
<b>Cobayo 4</b>	2,8	1,6	2,2	2,2	3,4	0	2,2	2,2
<b>Cobayo 5</b>	2,8	1,6	2,2	2,2	3,4	0	3,4	3,4
<b>Media Geométrica</b>	3,16	1,72	2,92	2,44	3,4	0,44	3,16	2,56
<b>p valor</b>	0,0001		0,1823		0,0001		0,1151	

Exp: Vacuna experimental; Com: Vacuna comercial. Los títulos se expresan como  $\text{Log}_{10}$  de la máxima dilución que resultó positiva al ELISA indirecto.

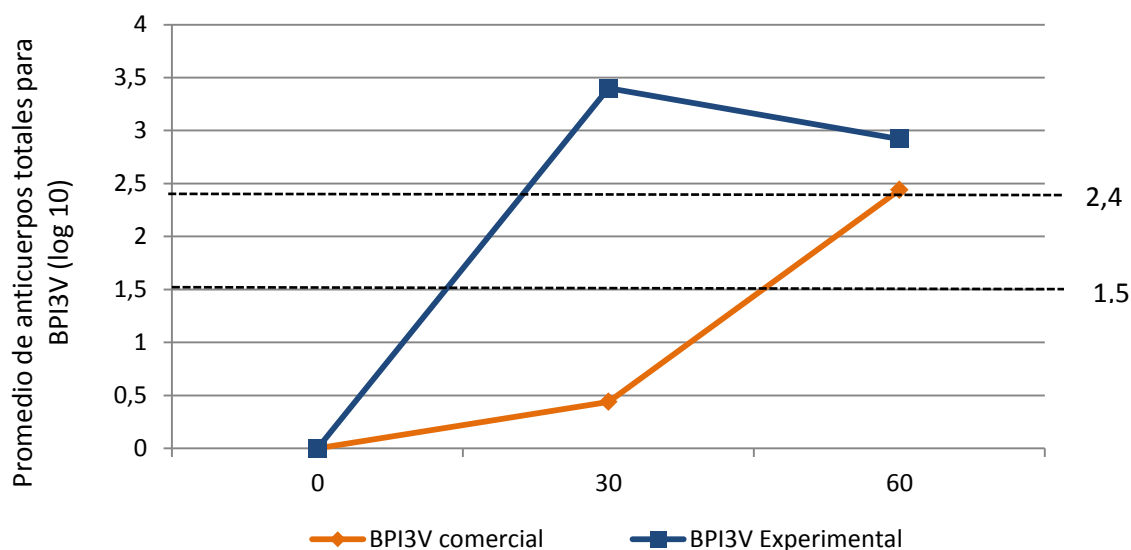
**Figura 24:** Dinámica de anticuerpos totales en cobayos contra BoHV1 detectados por ELISA indirecto al día 30 y día 60 posteriores a la aplicación de la primera dosis de vacuna inactivada conteniendo antígeno viral contra este virus.



Se tomó día 0 como el momento de aplicación de la primera dosis de vacuna y al ser los cobayos una especie naturalmente seronegativa para ambos virus el título de anticuerpo se le asignó valor cero (0).

-----: Límites inferior y superior a partir de los cuales la vacuna se considera en cobayos: No satisfactoria  $x < 1,93$ ; Satisfactoria  $1,93 \leq x \leq 3,02$  y Muy Satisfactoria  $x > 3,02$ .

**Figura 25:** Dinámica de anticuerpos totales en cobayos contra BPI3V detectados por ELISA indirecto al día 30 y día 60 posteriores a la aplicación de la primera dosis de vacuna inactivada conteniendo antígeno viral contra este virus.



Se tomó día 0 como el momento de aplicación de la primera dosis de vacuna y al ser los cobayos una especie naturalmente seronegativa para ambos virus, al título de anticuerpos se le asignó valor cero (0).

-----: Límites inferior y superior a partir de los cuales la vacuna se considera en cobayos: No satisfactoria  $x < 1,5$ ; Satisfactoria  $1,5 \leq x \leq 2,4$  y Muy Satisfactoria  $x > 2,4$ .

### **Discusión Prueba de Potencia en Cobayos**

La vacuna experimental contó con la dosis de antígeno necesaria para la inducción de una respuesta detectable de anticuerpos para ambas valencias (Romera *et al.*, 2001; OIE, 2012). Mediante la prueba de potencia en cobayos se determinó que, tanto la vacuna experimental como la vacuna comercial, contaban con la calidad inmunogénica mínima para ser aplicada en los huéspedes naturales.

Para BoHV1, mientras que con la vacuna experimental se lograron los títulos máximos de anticuerpos a los 30 días posteriores a la primera dosis, similares a los resultados obtenidos por Parreño *et al.* (2010a); con la vacuna comercial se requirieron hasta 60 días para alcanzar los picos de respuesta de anticuerpos a la vacunación. Estos mismos autores describen el día 30 como el punto de máxima diferenciación entre vacunas que difieren en 1 Log<sub>10</sub> en su concentración de antígeno. Por lo tanto, las diferencias halladas entre la vacuna experimental y la comercial en este estudio podrían explicarse por diferentes concentraciones de antígeno en las mismas.

Para BPI3V, se observó lo mismo. Con la vacuna experimental se lograron los títulos máximos de anticuerpos a los 30 días posteriores a la primera dosis, mientras que con comercial se requirieron hasta 60 días para alcanzar los niveles necesarios para su potencial aprobación (OIE, 2012). Debido a que esta prueba es capaz de discriminar significativamente entre vacunas oleosas formuladas con títulos de antígenos entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> y títulos de 10<sup>7</sup> o mayores, la diferencia podría estar dada por diferentes concentraciones de antígeno.



- **Evaluación de diferentes esquemas de vacunación en bovinos**

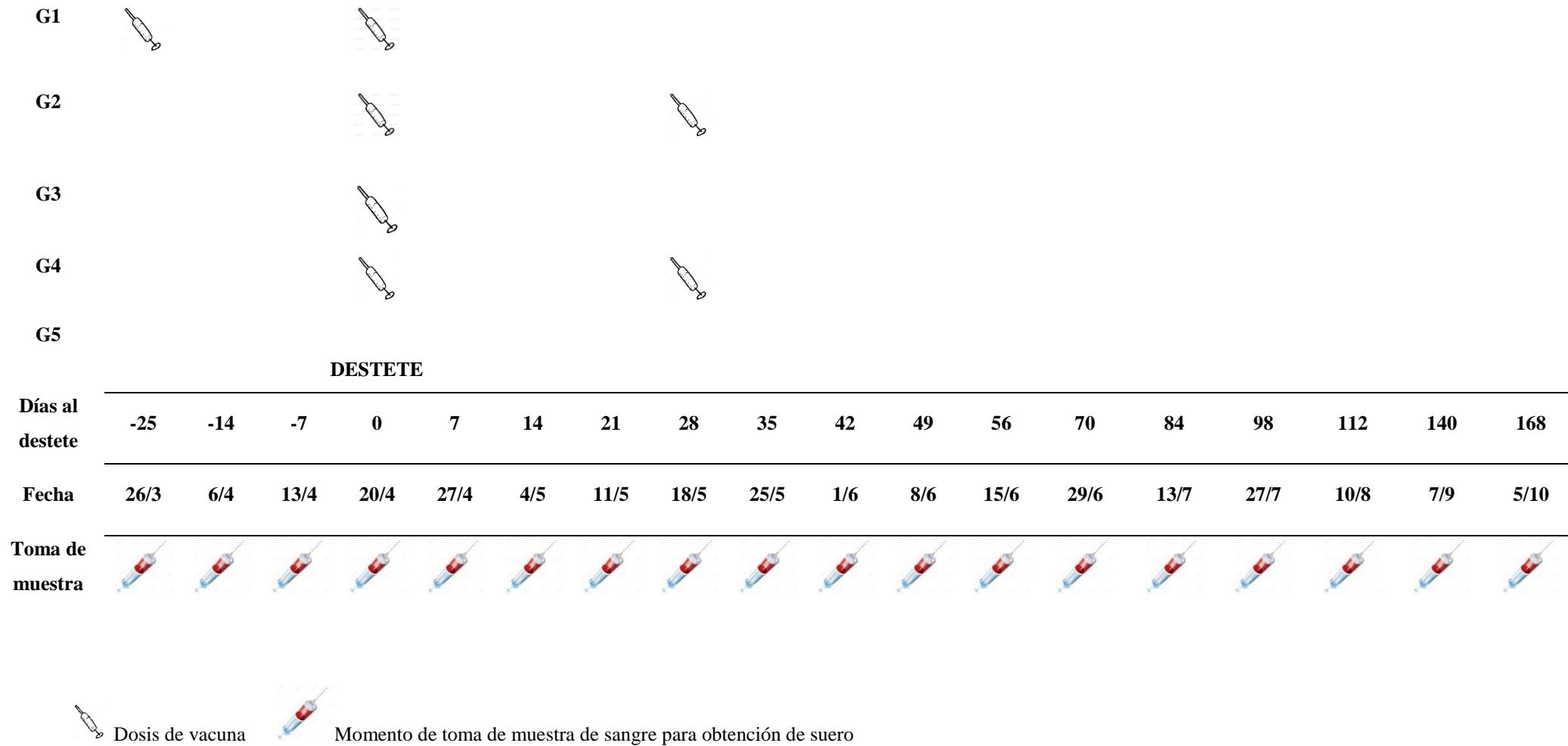
### **Materiales y Métodos**

El 26 de marzo de 2016, se inició en el Campo Experimental Agroforestal INTA Trevelin un ensayo para evaluar diferentes estrategias de vacunación contra CRB en terneros de destete utilizando las vacunas previamente evaluadas en modelo cobayo. Se trabajó con una población de 50 terneros de 6 a 8 meses de edad, producto de la cría del campo experimental. Los terneros se asignaron a 5 grupos de 10 animales cada uno según el peso corporal ( $174,27\text{kgPV} \pm 4,91$ ) (muestreo estratificado por peso con un nivel de confianza del 95%) (Figura 26).

- **GRUPO 1 (G1):** Aplicación de 2 dosis de vacuna experimental, la primera 25 días (26/3/2016) previo al destete y la segunda al destete (20/4/2016).
- **GRUPO 2 (G2):** Aplicación de dos dosis de vacuna experimental, la primera al destete (20/4/2016) y la segunda 28 días post destete (18/5/2016).
- **GRUPO 3 (G3):** Única dosis de vacuna experimental al destete (20/4/2016)
- **GRUPO 4 (G4):** Dos dosis de vacuna comercial, similar al grupo 2, la primera al destete (20/4/2016) y la segunda 28 días post destete (18/5/2016).
- **GRUPO 5 (G5):** Sin vacunar (Menantau-Horta *et al.*, 1985).

Se tomaron muestras de sangre de los animales correspondientes a los distintos grupos (Materiales y Métodos: Generalidades) para obtención de suero. Los muestreos se realizaron de la siguiente manera: los primeros 2 meses posteriores a la primera o única dosis, con una frecuencia semanal; durante el tercer y cuarto mes cada 14 días y durante el quinto y sexto mes cada 28 días (Figura 24) (Menantau-Horta *et al.*, 1985). La detección de anticuerpos totales se realizó mediante un ELISA indirecto para cada virus (Materiales y Métodos: Generalidades).

La comparación entre las medias geométricas de los títulos de anticuerpos entre los grupos en los diferentes momentos de toma de muestra se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con test de Tukey. Se utilizó el programa INFOSTAT<sup>®</sup>. Valores  $p < 0,05$  se consideraron diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 26:** Esquema de los diferentes momentos de vacunación y toma de muestras de suero de terneros.

G1: Dos dosis de vacuna experimental, primer dosis predestete; G2: Dos dosis de vacuna experimental, primer dosis al destete; G3: Una dosis de vacuna experimental al destete; G4: Dos dosis de vacuna comercial, primer dosis al destete; G5: sin vacuna.

## **Resultados esquemas de vacunación en bovinos**

Todos los terneros del ensayo estaban sanos al examen físico antes y al momento de iniciar el mismo. No se presentaron casos clínicos de CRB y/o queratoconjuntivitis. No se observaron reacciones locales en la zona de aplicación.

### **BoHV1**

En el G1 se alcanzaron niveles satisfactorios de anticuerpos a los 28 días posteriores a la primera dosis de vacuna. El pico de títulos de anticuerpos también se observó en ese momento, lo que representó 7 días posteriores a la segunda dosis.

En el G2, se alcanzaron niveles satisfactorios de anticuerpos a los 35 días posteriores a la primera dosis de vacuna. Esto coincidió con el pico en el título de anticuerpos. Este momento se ubica 14 días posteriores a la segunda dosis.

En el G3, se observaron niveles de anticuerpos no satisfactorios durante todo el ensayo.

En el G4 se alcanzan niveles satisfactorios de anticuerpos a los 21 días posteriores a la primera dosis de vacuna. El pico de títulos de anticuerpos se observó a los 28 días posteriores a la primera dosis y 7 días posteriores a la segunda dosis.

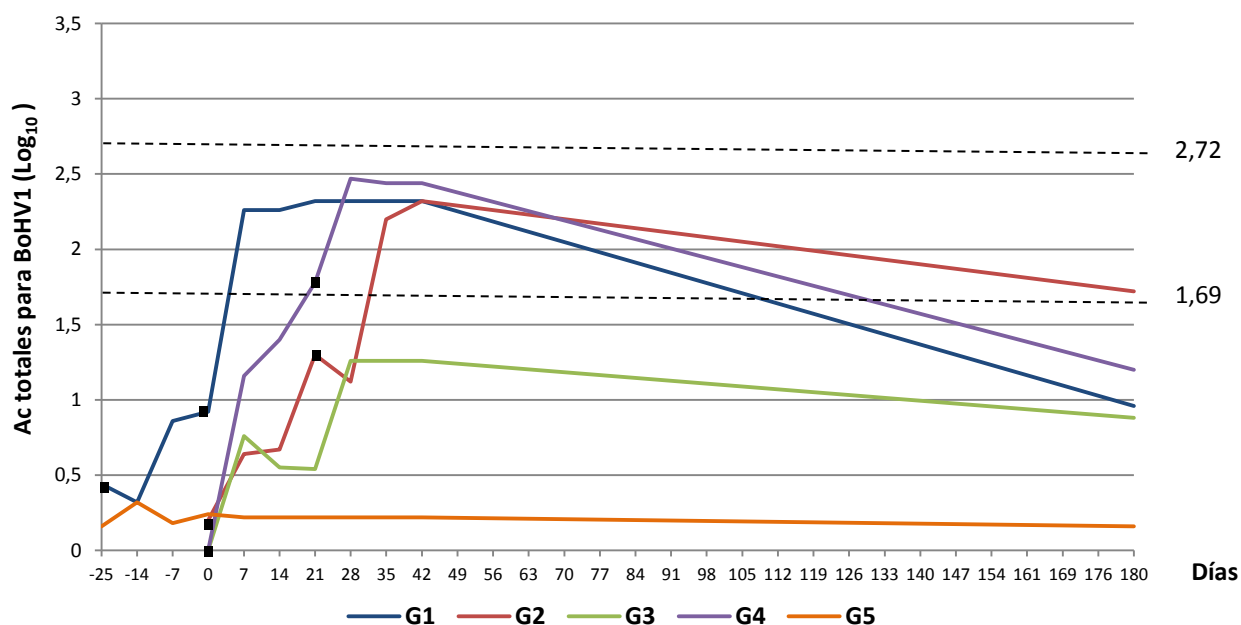
En el G5 no se observa circulación viral. Nueve de los animales siempre resultaron negativos a excepción de uno que permaneció seropositivo durante todo el ensayo.

A los 6 meses del ingreso de los animales no se observaron niveles satisfactorios de anticuerpos en ningún grupo (Tabla 26 y Figura 27).

**Tabla 26:** Título de anticuerpos totales para BoHV1 en terneros de entre 6 y 8 meses de vida vacunados con vacuna experimental y comercial bajo diferentes esquemas.

Virus	BoHV1					P valor
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
<b>Días</b>						
<b>0</b>	0,4	0,2	0	0	0,5	0,3709
<b>7</b>	0,3	0,6	0,8	1,2	0,3	0,2146
<b>14</b>	0,9 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,6 <sup>ab</sup>	1,4 <sup>b</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,0582
<b>21</b>	0,9 <sup>abc</sup>	1,3 <sup>bc</sup>	0,5 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>c</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,0012
<b>28</b>	2,3 <sup>c</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	1,3 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>	0,2 <sup>a</sup>	<0,001
<b>35</b>	2,3 <sup>c</sup>	2,2 <sup>c</sup>	1,3 <sup>b</sup>	2,4 <sup>c</sup>	0,2 <sup>a</sup>	<0,001
<b>42</b>	2,3 <sup>c</sup>	2,3 <sup>c</sup>	1,3 <sup>b</sup>	2,3 <sup>c</sup>	0,2 <sup>a</sup>	<0,001
<b>180</b>	0,9 <sup>ab</sup>	1,7 <sup>b</sup>	0,9 <sup>ab</sup>	1,2 <sup>ab</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,0162

Virus: Tipo de virus para los que se midieron anticuerpos; Días: Momento de toma de muestra de suero; Grupo 1: Dos dosis de vacuna experimental con la primera dosis predestete; Grupo 2: Dos dosis de vacuna experimental con la primera dosis al destete; Grupo 3: Una dosis de vacuna experimental al destete; Grupo 4: Dos dosis de vacuna comercial con la primera dosis al destete; Grupo 5: animales sin vacunar; ■: Momentos de aplicación de dosis de vacunas. Los títulos se expresan como  $\text{Log}_{10}$  de la máxima dilución que resultó positiva al ELISA indirecto. Medias geométricas con letras diferentes en el mismo día (fila) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 27:** Dinámica de anticuerpos totales para BoHV1 bajo diferentes esquemas de vacunación en terneros de entre 6-8 meses.

■ : Dosis de vacunas; G1: Dos dosis de vacuna experimental separadas de 25 días con la primera dosis pre destete; G2: Dos dosis de vacuna experimental separadas de 21 días con la primera dosis al destete; G3: Una dosis de vacuna experimental al momento del destete; G4: Dos dosis de vacuna comercial separadas de 21 días con la primera dosis al destete; G5: sin vacunar.

-----: Límites inferior y superior a partir de los cuales la vacuna se considera en bovinos: No satisfactoria  $x < 1,69$ ; Satisfactoria  $1,69 \leq x \leq 2,72$  y Muy Satisfactoria  $x > 2,72$ .

**BPI3V**

En todos los grupos se observaron anticuerpos al inicio del ensayo.

En el G1, G2 y G4, se alcanzaron niveles satisfactorios de anticuerpos a los 28 días posteriores a la primera dosis de vacuna. Los picos de títulos de anticuerpos coincidieron con los momentos anteriores y tuvieron lugar a los 7 días posteriores a la segunda dosis.

En el G3 el pico de anticuerpos se observó a los 21 días posteriores a la única dosis de vacuna. Este nivel, apenas por debajo del límite inferior para que la vacuna sea considerada satisfactoria, se mantuvo hasta el final del ensayo.

En el G5 se observó circulación viral posterior al día 84 post destete.

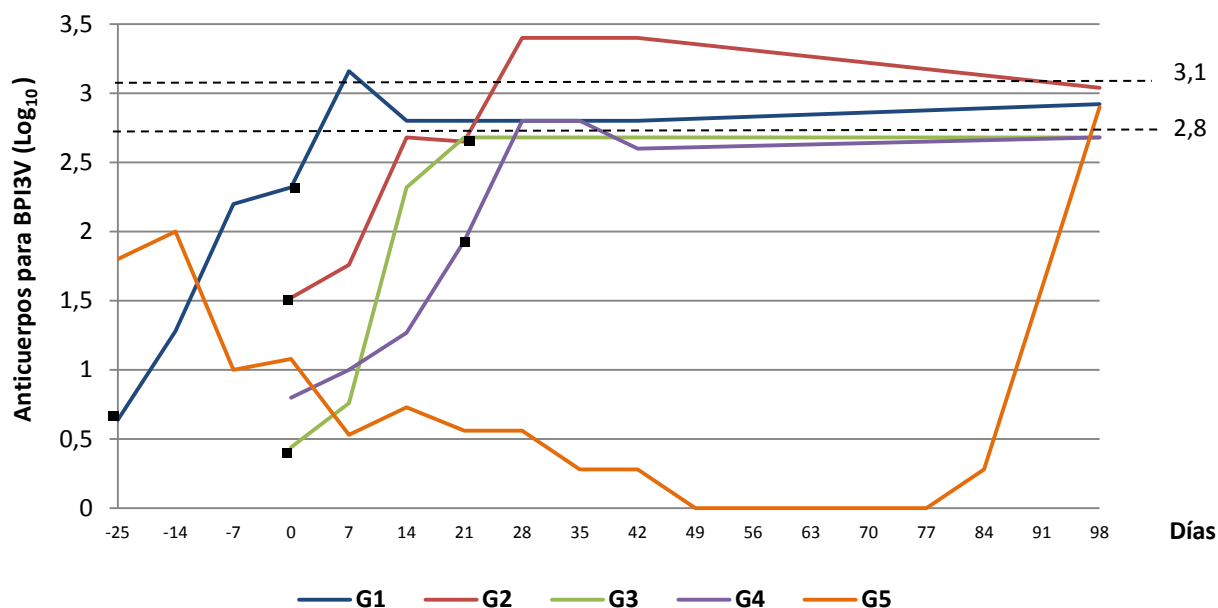
A los 6 meses del ingreso de los animales no se observaron niveles satisfactorios de anticuerpos en ningún grupo (Tabla 27 y Figura 28).

**Tabla 27:** Título de anticuerpos totales para BPI3V en terneros de entre 6 y 8 meses de vida vacunados con vacuna experimental y comercial bajo diferentes esquemas de vacunación.

Virus	BPI3V					P valor
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
Grupo						
Días						
0	0,6	1,5	0,4	0,8	1,8	0,0475
7	1,3	1,8	0,8	1	2	0,1783
14	2,2 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,3 <sup>ab</sup>	1,3 <sup>ab</sup>	1 <sup>a</sup>	0,0190
21	2,3 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,0292
28	3,2 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>	0,5 <sup>a</sup>	<0,001
35	2,8 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>	0,7 <sup>a</sup>	<0,001
42	2,8 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	0,6 <sup>a</sup>	<0,001
84	2,9 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>	<0,001
98	2,9	3	2,7	2,7	2,9	0,7703

Virus: Tipo de virus para los que se midieron anticuerpos; Días: Momento de toma de muestra de suero; Grupo 1: Dos dosis de vacuna experimental con la primera dosis previo al destete; Grupo 2: Dos dosis de vacuna experimental la primera dosis al destete; Grupo 3: Una dosis de vacuna experimental al destete; Grupo 4: Dos dosis de vacuna comercial con la primera dosis al destete; Grupo 5: animales sin vacunar; ■: Momentos de aplicación de dosis de vacunas. Los títulos se expresan como  $\log_{10}$  de la máxima dilución que resultó positiva al ELISA indirecto. Medias geométricas con letras diferentes en el mismo día (fila) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 28:** Dinámica de anticuerpos totales para BPI3V de diferentes esquemas de vacunación contra CRB en terneros de entre 6-8 meses



■ : Dosis de Vacunas; G1: Dos dosis de vacuna experimental separadas de 25 días con la primer dosis pre destete; G2: Dos dosis de vacuna experimental separadas de 21 días con la primer dosis al destete; G3: Una dosis de vacuna experimental al momento del destete; G4: Dos dosis de vacuna comercial separadas de 21 días con la primer dosis al destete; G5: sin vacunar.

-----: Límites inferior y superior a partir de los cuales la vacuna se considera en bovinos: No satisfactoria  $x < 2,8$ ; Satisfactoria  $2,8 \leq x \leq 3,1$  y Muy Satisfactoria  $x > 3,1$ .

## Discusión esquemas de vacunación en bovinos

### BoHV1

En los grupos de terneros en los que se aplicaron dos dosis de vacunas (G1, G2 y G4), tanto experimental como comercial, se observaron niveles satisfactorios de anticuerpos para BoHV1 a partir de los 21-35 días de aplicada la primer dosis, lo que representa entre 0-14 días posterior a la segunda dosis. En esta línea, Castrucci *et al.* (2002) observaron luego de la aplicación de vacunas inactivadas y con concentraciones similares a la utilizadas en este trabajo, que los títulos de anticuerpos estaban presentes a los 30 días de aplicada la primera dosis y 10 días posterior a la segunda dosis. Los hallazgos también coinciden con Parreño *et al.* (2010a), que observaron picos de títulos de anticuerpos a los 30 y 60 días posteriores a la primera dosis de vacuna, para luego mantenerse en una meseta o comenzar a disminuir.

En el grupo (G3) donde se aplicó una sola dosis, no se detectaron niveles satisfactorios de anticuerpos. Este hallazgo resulta similar al de Pospizil *et al.* (1996), quienes observaron que los títulos de anticuerpos para BoHV1 en animales, con serología previa o no, aumentan

sustancialmente luego de la segunda dosis de vacuna. Pero difiere a lo reportado por Patel (2005) quien no observó una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos neutralizantes ni en la cantidad de animales positivos luego de la aplicación de una segunda dosis de una vacuna inactivada para BoHV1.

En los terneros, el ensayo para BoHV1 fue válido ya que el G5, que no recibió vacuna, mantuvo el nivel inicial de anticuerpos hasta el día 180, tal lo esperado para rodeos endémicos (Parreño *et al.*, 2010a). Los niveles de anticuerpos para BoHV1 hallados en el G1 y G2 al momento de la aplicación de la primera dosis de vacuna, corresponderían a la presencia de anticuerpos calostrales. Esto último teniendo en cuenta lo discutido en el Capítulo 1.

### **BPI3V**

Todos los grupos de terneros vacunados seroconvirtieron luego de la primera dosis de vacuna. Esto podría deberse a que los animales ingresaron al ensayo con anticuerpos previos, por lo que la vacuna podría haber funcionado como *booster*. Sin embargo fue 7 días posteriores a la segunda dosis en el G1, G2 y G4 que se alcanzaron niveles satisfactorios de anticuerpos para BPI3V. En el G4 a partir del día 42 posterior a la primera dosis los niveles de anticuerpos se sostuvieron en niveles cercanos pero inferiores al límite para que la respuesta pueda ser considerada satisfactoria. Lo mismo ocurrió con el G3, en el que sólo se alcanzaron niveles cercanos pero inferiores al límite en todo momento.

Se observó seroconversión en el G5 a partir del día 84 post destete. Sin embargo, el ensayo se consideró válido para esta valencia, ya que se pudo observar la cinética de anticuerpos para BPI3V de manera inmediata a la aplicación de las vacunas y previo al momento de circulación tal cual lo planteado por Salt *et al.* (2007). A su vez, y teniendo en cuenta lo analizado en el Capítulo 1, los niveles de anticuerpos hallados en todos los grupos al momento de la aplicación de la primera dosis de vacuna, corresponderían a anticuerpos calostrales.

Tal lo sugerido por Odeón (2008) y lo planteado como hipótesis del presente trabajo, resultan necesarias la aplicación de dos dosis de vacuna inactivada para obtener niveles de anticuerpos satisfactorios, tal lo descrito por Parreño *et al.*, (2010<sup>a</sup>) para la prevención del desarrollo de signos clínicos severos y al reducción de la eliminación y diseminación viral luego de una infección.

En la misma hipótesis de trabajo se planteó que los momentos de aplicación deberían ser la primera dosis previa al destete y la segunda al momento del destete. De este trabajo se desprende que la ocurrencia de casos clínicos de CRB ocurrieron después de los 30 días del

ingreso de los animales a las invernadas (Capítulo 2). Por lo que la aplicación de la primera dosis al destete y la segunda 21 días después, resulta en una estrategia válida para la zona de estudio, ya que se alcanzarían niveles satisfactorios de anticuerpos para ambas valencias previas al momento de ocurrencia de casos clínicos de CRB. Esto último, resulta diferente a lo planteado por Engelken *et al.* (1997), Odeón (2008) y Poe *et al.* (2013), que opinan que la primera dosis debiera ser previa al destete y la segunda al destete. En este trabajo esto tendría que ver con las particularidades observadas en los factores de riesgo asociados a la ocurrencia de casos de CRB, tal como fue el efecto de las lluvias constantes características del invierno en la zona. Sin embargo, esta estrategia, podría ser válida, tomando como parámetro la ocurrencia de casos clínicos y no a la circulación viral. En este sentido las vacunas además de prevenir la ocurrencia de casos clínicos disminuyen el tiempo y la cantidad de virus excretado en caso de infección, lo que permitiría limitar la circulación viral (Romera *et al.*, 2001). Ante este planteo, y teniendo en cuenta que los 3 virus circularon a partir del momento del ingreso de los terneros a las invernadas, podría resultar una estrategia válida la aplicación de la primera dosis previo al destete y la segunda al destete tal como lo planteado por Engelken *et al.* (1997), Odeón (2008) y Poe *et al.* (2013) según sea el manejo que realice cada invernada en particular.



# Conclusiones

- 
- Se confirmó la circulación de los virus BoHV1, BPI3V y BVDV en las invernadas del Valle 16 de Octubre. La circulación de BoHV1 estuvo asociada a un cuadro natural de queratoconjuntivitis, BPI3V circuló a partir de la llegada de los animales a las invernadas y BVDV estuvo asociado a la mezcla de animales de diferentes orígenes.
  - Se logró aislar por primera vez en Argentina BoHV1 subtipo 2.a. de animales con signos clínicos compatibles con la infección viral por este virus.
  - Se confirmó que el genotipo circulante de BPI3V en Patagonia es el A.
  - La humedad persistente a causa de las abundantes precipitaciones características del Valle 16 de Octubre en época invernal, sería el principal factor de riesgo en la ocurrencia de casos clínicos de CRB actuando de manera directa sobre el cuerpo del animal y de manera indirecta a través de la formación de barro, afectando la capacidad de termorregulación de los animales.
  - Se confirma que son necesarias dos dosis de vacuna en los terneros para generar una respuesta inmune satisfactoria. Teniendo en cuenta las características de los sistemas de cría o intensivos o engorde bovinos en la región en estudio, la estrategia de elección sería aplicar la primera dosis al momento del ingreso de los animales a las invernadas y la segunda dosis entre 21-28 días posteriores

# **Bibliografía**

1. Allen, J.W.; Viel, L.; Bateman, K.G.; Nagy, E.; Rosendal, S.; Shewen, P.E. (1992). Serological Titers to Bovine Herpesvirus 1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Parainfluenza 3 Virus, Bovine Respiratory Syncytial Virus and Pasteurella haemolytica in Feedlot Calves with Respiratory Disease: Associations with Bacteriological and Pulmonary Cytological Variables. *Can J Vet Res.* **56**, 281-288.
2. Allen, J.W.; Viel, L.; Bateman, K.G.; Rosendal, S.; Shewen, P.E.; Physick-Sheard, P. (1991). The Microbial Flora of the Respiratory Tract in Feedlot Calves: Associations between Nasopharyngeal and Bronchoalveolar Lavage Cultures. *Can J Vet Res.* **55**, 341-346.
3. Antuña, C.; Rossanigo, C.; Arano, A.; Caldera, J. (2010). Análisis de la actividad ganadera bovina de carne por estratos de productores y composición del stock años 2008 y 2009. Provincia de Chubut. Observatorio Estratégico. INTA-SENASA-RIAN. 22p
4. Apóstolo, R.; Martínez Stanziola, J.P.; Mellado, J.; Castillo, P.; Ceballos, D. (2018). Utilización y evaluación de diferentes métodos de castración en terneros. Carpeta Técnica Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel. Ganadería N° 57.
5. Apóstolo, R.; Maidana, S.; Martínez, J.P.; Romera, S.A.; Robles, C. (2017). Primer aislamiento de Herpes Virus Bovino tipo 1 en bovinos de Patagonia, Argentina. *Rev. Med. Vet.* **98(2)**, 16-20.
6. Apóstolo, R.M.; Maidana, S.S.; Turcato, A.; Roberts, V.; Martínez Stanziola, J.P.; Romera, S.A.; Robles, C.A. (2016). Relevamiento serológico y primer aislamiento del virus de la parainfluenza bovina 3 en bovinos de Patagonia, Argentina. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología pp 84-85.
7. Arias, R.A.; Mader, T.L.; Escobar, P.C. (2008). Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch Med Vet.* **40**, 7-22.
8. Babcock, A.H.; Renter, D.G.; White, B.J.; Dubnicka, S.R.; Scott, H.M. (2010). Temporal distributions of respiratory disease events within cohorts of feedlot cattle and associations with cattle health and performance indices. *Prev Vet Med.* **97**, 198–219.
9. Babcock, A.H.; White, B.J.; Dritz, S.S.; Thomson, D.U.; Renter, D.G. (2009). Feedlot health and performance effects associated with the timing of respiratory disease treatment. *J Anim Sci.* **87**, 314-327.
10. Babiuk, L.A.; van Drunen Little-van den Hurk, S.; Tikoo, S.K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* **53**, 3 1-42.
11. Babiuk, L.A.; Lawman, M.J.; Ohmann, H.B. (1988). Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Adv Virus Res.* **35**, 219-49.
12. Bahnemann, H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* **8(4)**, 299–303.
13. Bagnis, G.; Rabaglino, M.B.; Raviolo, J.M.; Schleef, N. (2006). Estudio histopatológico, etiológico e inmunohistoquímico de lesiones compatibles con neumonías intersticiales en el ganado bovino. *Revista Electrónica de Veterinaria.* VII, N° 09.
14. Balling, R.C. Jr. (1980). An assessment of the impact of weather conditions on feedlot cattle performance. *Center for Agricultural Meteorology and Climatology.* University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE. CAMaC Progress report 80-3.
15. Barra F. (2009). El negocio es saber leer. *Ganadería y Compromiso.* **12**, 10-11. Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina.

16. Basualdo, J.A.; Grenovéro, M.S.; Minvielle M.C. (2005). *Nociones Básicas de Metodología de la Investigación en Ciencias de la Salud*. 2° Ed. Tomo 2. La Plata.
17. Bavera, G.A. (2012). El origen del término invernada. Sitio Argentino de Producción Animal. En: <http://www.produccion-animal.com.ar/>, consultado el 2/10/2018.
18. Bavera, G.A. (2011). Razas bovinas y bubalinas de la Argentina. 1° Ed. Editorial Imberti-Bavera. Río Cuarto. En: [http://www.produccion-animal.com.ar/libros\\_on\\_line/61-Razas\\_bovinas\\_y\\_bufalinas.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/libros_on_line/61-Razas_bovinas_y_bufalinas.pdf), consultado el 20/11/2018.
19. Bavera, G.A.; Beguet, H.A. (2003). Termorregulación corporal y ambientación. Sitio Argentino de Producción Animal, Producción Bovina de Carne, Curso de producción Bovina de Carne. En: [http://www.produccion-animal.com.ar/clima\\_y\\_ambientacion/04-termorregulacion\\_corporal\\_y\\_ambientacion.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/clima_y_ambientacion/04-termorregulacion_corporal_y_ambientacion.pdf), consultado el 15/11/2018.
20. Bavera, G.A.; Peñafort, C.H. (2006). Lectura de la bosta del bovino y su relación con la alimentación. Sitio Argentino de Producción Animal, Producción Bovina de Carne, Curso Parcial de Producción Bovina de Carne I, Manejo del alimento. En: <http://www.produccion-animal.com.ar/>, consultado el 28/8/2018.
21. Blecha, F.; Boyles, S.L.; Riley, J.G. (1984). Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman x Angus feeder calves. *J Anim Sci*. **59**, 576-583.
22. Booker, C.W.; Timothy Guichon, P.; Kee Jim, G.; Schunicht, O.C.; Harland, R.J., Morley, P.S. (1999). Seroepidemiology of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *Can Vet J*. **40**, 40-48.
23. Brackenbury, L.S.; Carr, B.V.; Charleston, B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol*. **96**, 337-344.
24. Bratanich, A.; Sardi, S.; Smitsaart, E.; Estevez Madero, J.; Schudel, A.A. (1990). Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serum neutralization, enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Rev Argent Microbiol*. **22**, 192-198.
25. Buczinski, S.; Rademacher, R.D.; Tripp, H.M.; Edmonds, M.; Johnson E.G.; Dufour, S. (2015). Assessment of l-lactatemia as a predictor of respiratory disease recognition and severity in feedlot steers. *Prev Vet Med*. **118**, 306-318.
26. Cardozo, E.; Banchemo, L. A.; Guarino, H.; Diana, V.; Lozano, A. (2008). Análisis de la asociación de Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa con Herpes Virus Bovino- 1, en terneros de tres meses a un año de edad en el Uruguay. *Veterinaria*. **44(172)**, 17-22.
27. Carriere, P.D.; Maxie, M.G.; Wilkie, B.N.; Savan, M.; Valli, V.E.O.; Johnson, J.A. (1983). Exposure of Calves to Aerosols of Parainfluenza-3 Virus and Pasteurella haemolytica. *Can J Comp Med*. **47**, 422-432.
28. Castrucci, G.; Frigeri, F.; Salvatori, D.; Ferrari, M.; Sardonini, Q.; Cassai, E.; Lo Dico, M.; Rotola, A.; Angelini, R. (2002). Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of protective value of eight vaccines. *Comp Immunol Microb*. **25**, 29-41.
29. Claus, M.P.; Fernandes Alfieri, A.; Valadares Folgueras-Flatschart. A.; Rezler Wosiacki, S.; Medici, K.C.; Alfieri, A.A. (2005). Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods*. **128**, 183-188.

30. Cole, N.A.; Mc Laren, J.B.; Hutcheson, D.P. (1982). Influence of preweaning and b-vitamin supplementation of the feedlot receiving diet on calves subjected to marketing and transit stress. *J Anim Sci.* **54**, 911-917.
31. Colombani E.N.; Arbuniés, R. (2008). Distribución de las precipitaciones en la provincia del Chubut. XII Reunión Argentina de Agrometeorología. pp 9-10.
32. Coria, M.F.; McClurkin, A.W. (1978). Duration of Active and Colostrum-derived Passive Antibodies to Bovine Viral Diarrhea Virus in Calves. *Can J Com. Med.* **40**, 239-243.
33. Costa, E.F.; Giuliadori, M.J.; Dezzilio, M.; Romero, J. (2003). Mortalidad en un feed lot de La Plata (Buenos Aires- Argentina): Causas, distribución mensual e impacto económico. *Analecta Veterinaria.* **23(1)**, 13-19.
34. Cusack, P.M.V.; Mahony, T.J. (2016). Evaluation of practices used to reduce the incidence of bovine respiratory disease in Australian feedlots. Meat & Livestock Australia Limited, pp 29.
35. Cusack, P.M.V.; McMeniman, N.; Lean, I.J. (2007). Feedlot entry characteristics and climate: their relationship with cattle growth rate, bovine respiratory disease and mortality. *Aust Vet J.* **85(8)**, 311-316.
36. Cusack, P.M.V.; McMeniman, N.; Lean, I.J. (2003). The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J.* **81(8)**, 480-487.
37. De Blas, N.; Ortega, C.; Frankena, K.; Noordhuizen, J.; Thrusfield, M. (2000). Win Episcopo 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk/>).
38. De Yañiz, G.; Fiorentino, A.; Sanchez Bruni, S. (2018). Neumonías en engordes: Una problemática recurrente. Artículo de divulgación en: [https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta\\_vr121-4.salud\\_animal.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_vr121-4.salud_animal.pdf), consultado el 3/10/2018.
39. Del Médico Zajac, M.P.; Puntel, M.; Zamorano, P.I.; Sadir, A.M.; Romera, S.A. (2006). BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci.* **81**, 327-334.
40. Duff, G.C. y Galyean M.L. (2007). BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J Anim Sci.* **85**, 823-840.
41. Engelken, T.J. (1997). Preventative programs for respiratory disease in cow/calf operations. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* **13 (3)**, 647-660.
42. Engels, M.; Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.* **53**, 3- 15.
43. Ezzi, A.; Bakhshesh, M.; Hatami, A.; Shoukri, M.R. (2011). Study on duration of maternal antibodies in calves against Bovine Herpes virus type 1 (BHV-1). *Archives of Razi Institute.* **66(1)**, 25-28.
44. Fell, L.R.; Walker, K.H.; Reddacliff, L.A.; Davies, L.; Vallance, H.J.; House, J.R.; Wilson, S.C. (2007). Effects of yard weaning and pre-feedlot vaccination on feedlot performance of bos taurus steers. *P Aus S Ani*, **22**, 173-176.
45. Fulton, R.W.; Confer, A.W. (2012). Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: Gold standards for diagnosis, do they exist?. *Can Vet J.* **53(7)**, 754-761.
46. Fulton, R.W.; Hessman, B.; Johnson, B.J.; Ridpath, J.F.; Saliki, J.T.; Burge, L.J.; Sjeklocha, D.; Confer, A.W.; Funk, R.A.; Payton, M.E. (2006). Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in

- persistently infected cattle entering a feedlot. *JAVMA*. 228(4), 578-584.
47. Fulton, R.W.; Briggs, R.E.; Ridpath, J.F.; Saliki, J.T.; Confer, A.W.; Payton, M.E.; Duff, G.C.; Step, D.L.; Walker, D.A. (2005). Transmission of *Bovine viral diarrhea virus* 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can J Vet Res*. **69**, 161-169.
48. Fulton, R.W.; Briggs, R.E.; Payton, M.E.; Confer, A.W.; Saliki, J.T.; Ridpath, J.F.; Burge, L.J.; Duff, G.C. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*. **22**, 643-649.
49. Fulton, R.W.; Cook, B.J.; Step, D.L.; Confer, A.W.; Saliki, J.T.; Payton, M.E.; Burge, L.J.; Welsh, R.D.; Blood, K.S. (2002). Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *J Vet Res*. **66**(3), 173-180.
50. Fulton, R.W.; Saliki, J.T.; Confer, A.W.; Burge, L.J.; d'Offay, J.M.; Helman, R.G.; Bolin, S.R.; R.E.; Ridpath, J.F.; Payton, M.E. (2000a). Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest*. **12**, 33-38.
51. Fulton, R.W.; Purdy, C.W.; Confer, A.W.; Saliki, J.T.; Loan, R.W.; Briggs, R.E.; Burge, L.J. (2000b). Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*. **64**, 151-159.
52. Galyean, M.L.; Perino, L.J.; Duff G.C. (1999). Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *J Anim Sci*. **77**, 1120-1134.
53. Gardner, B.A.; Dodezal, H.G., Bryant, L.K.; Owens, F.N.; Smith, R.A. (1999). Health of finishing steers: effects on performance, carcass traits, and meat tenderness. *J Anim Sci*. **77**, 3168-3175.
54. Grandin, T.; Oldfield, J.E.; Boyd, L.J. (1998). Review: Reducing Handling Stress Improves Both Productivity and Welfare. *The Professional Animal Scientist*. **14**(1), 1-10.
55. Guarino, H.; Nuñez, A.; Repiso, M.V.; Dargatz, D.A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*. **85**, 34-40.
56. Guitart, E.; Fertig, M.; Bottaro, H.; Buratovich, O.; Villa M. (2004). Diagnóstico productivo orientado a establecer la capacidad del sector ganadero del NO del Chubut para involucrarse y sostener un proyecto de diferenciación por la calidad del producto carne vacuna. Programa para el desarrollo local y competitividad de pequeñas empresas. BID-ADT/ME7295-AR Subprograma Esquel y noroeste del Chubut. Componente N° 1: Fortalecimiento y diversificación productiva. Informe Final.
57. Guitart Fité, E. (2008). Caracterización de la Ganadería Bovina en Patagonia Sur. Carpeta Técnica Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel. Economía N° 9.
58. Häggglund, S.; Svensson, C.; Emanuelson, U.; Valarcher, J.F.; Alenius, S. (2006). Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet J*. **172**, 320-328.

- 59.Houe, H.; Lindberg, A.; Moennig, V. (2006). Review article. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* **18**, 427–436.
- 60.Houe, H.; Baker, J.C.; Maes, R.K.; Wuryastuti, H.; Wasito, R.; Ruegg, P.L.; Lloyd, J.W. (1995). Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J Vet Diagn Invest.* **7**, 321-326.
- 61.ICTV. (2015)(2018). International Committee on Taxonomy of Viruses. En: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, consultado: 24/5/2019.
- 62.INTA. (2019). Datos meteorológicos de Trevelin. En: <https://inta.gob.ar/documentos/datos-meteorologicos-de-trevelin>, consultado el 15/1/2019.
- 63.INTA. (2018). Informe de precios de carne y ganado de la Patagonia. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Informe N°48.
- 64.INTA (2015). Situación actual y perspectiva de la ganadería en Patagonia Sur. Centro Regional Patagonia Sur – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. En: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_situacion\\_actual\\_perspectivas\\_ganaderia\\_patagonia\\_sur.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_situacion_actual_perspectivas_ganaderia_patagonia_sur.pdf), consultado: 25/7/2018.
- 65.Juarez Barranco, F.; Trigo Tavera, F.J.; Chavez Gris, G.; Vargas García, R.E. (2003). Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. *Vet Mex.* **34(1)**, 1-12.
- 66.Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.; Palmer, N. (1990). Patología de los animales domésticos. Tomo 2, pp 513- 554. 3° Ed. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay.
- 67.Kaashoek, M.J.; Rijsewijk, F.A.M.; Van Oirschot, J.T. (1996). Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Microbiol.* **53**, 103-110.
- 68.Ladelfa, M.F. (2010). Estudio de las propiedades replicativas in vitro de la cepa A663 de Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) y de la función de la proteína Us3. Tesis Doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- 69.Lemaire, M.; Weynants, V.; Godfroid, J.; Schynts, F.; Meyer, G.; Letesson, J.J.; Thiry, E. (2000). Effects of Bovine Herpesvirus Type 1 Infection in Calves with Maternal Antibodies on Immune Response and Virus Latency. *J Clin Microbiol.* **38(5)**, 1885-1894.
- 70.Lértora, W.J. (2003). Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet.* **14(1)**, 42-51.
- 71.Loerch, S.C.; Fluharty, F.L. (2000). Use of trainer animals to improve performance and health of newly arrived feedlot calves. *J Anim Sci.* **78**, 539-545.
- 72.Lofgreen, G.P. (1983). Nutrition and management of stressed beef calves. *Vet. Clin. Nth Am Food Anim. Pract.* **5**, 87-101.
- 73.Loneragan, G.H.; Thomson, D.U.; Montgomery, D.L.; Mason, G.L; Larson, R.L. (2005). Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. *JAVMA.* **226 (4)**, 595-601.
- 74.MAGyP. (2013). Resolución 141/13. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca SANIDAD ANIMAL Estatus Sanitario. Normas reglamentarias. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.



75. Maidana, S.S.; Miño, S.; Apóstolo, R.M.; De Stefano, G.A.; Romera, S.A. (2020). A new molecular method to rapid subtyping of bovine herpesvirus 1 field isolates. *J Vet Diagn Invest.* **32**(1), 112-117.
76. Maidana, S.S.; Marin, M.; Destefano, G.; Combessies, G.; Romera, S.A. (2018). Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1): actualización de las cepas circulantes en Argentina. *Rev. Vet.* **29** (1), 52-56.
77. Maidana, S.S.; Craig, M.I.; Re, J.I.; Odeón, M.M.; Romera, S.A. (2016). Desarrollo de una técnica molecular para la rápida detección y subtipificación de aislamientos de BoHV1. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología pp 105-106.
78. Maidana, S.; Ferrufino, C.; Romera, S.A. (2013). Desarrollo de un ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos bovinos contra parainfluenza virus 3. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Moron.* **11**.
79. Maidana, S.S.; Lomonaco, P.M.; Combessies, G.; Craig, M.I.; Diodati, J.; Rodriguez, D.; Parreño, V.; Zabal, O.; Konrad, J.L.; Crudelli, G.; Mauroy, A.; Thiry, E.; Romera, S.A. (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Vet Res.* **8**, 83.
80. Marini, M.R.; Pezzone, N.; Gollán, A.; Ortega, H.H.; Pachoud, J.C.; Pontarelli, E.L.; Canal, A.M. (2012). Detección del virus de la diarrea viral bovina mediante inmunohistoquímica en fetos bovinos abortados y comparación con resultados del aislamiento viral. *Rev. Med. Vet.* **93**, 21 – 27.
81. Martin, S.W.; Bateman, K.G.; Shewen, P.E.; Rosendal, S.; Bohac, J.E. (1989). The Frequency, Distribution and Effects of Antibodies, to Seven Putative Respiratory Pathogens, on Respiratory Disease and Weight Gain in Feedlot Calves in Ontario. *Can J Vet Res.* **53**, 355-362.
82. Martin, S.W. y Bohac, J.G. (1986). The Association Between Serological Titers in Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, Bovine Virus Diarrhea Virus, Parainfluenza-3 Virus, Respiratory Syncytial Virus and Treatment for Respiratory Disease in Ontario Feedlot Calves. *Can J Vet Res.* **50**, 351-358.
83. Martin, S.W.; Meek, A.H.; Davis, D.G.; Johnson, J.A.; Curtis, R.A. (1982). Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: The Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980. *Can J Comp Med.* **46**, 341-349.
84. McGuirk, S.M. y Peek, S.F. (2014). Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. *Anim Health Res Rev.* **15**(2), 145-147.
85. Menanteau-Horta, A.M.; Ames, T.R.; Johnson, D.W.; Meiske, J.C. (1985). Effect of Maternal Antibody Upon Vaccination With Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Virus Diarrhea Vaccines. *Can J Comp Med.* **49**, 10-14.
86. Moerman, A.; Straver, P.J.; de Jong, M.C.M. (1993). A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet Rec.* **132**, 622–626.
87. Morano, C.D.; Maidana, S.S.; Siedler, B.; Silva, G.; Combessies, G.; Romera, S.A. (2011). Aislamiento de subtipo 1.2b de BoHV-1 en brote de queratoconjuntivitis en un rodeo bovino. X Congreso Argentino de Virología, III Simposio Argentino de Virología Clínica, I Simposio Argentino de Virología Veterinaria, III Encuentro de Virólogos latinoamericanos.
88. Narayanan, S.K.; Nagaraja, T.G.; Chengappa, M.M.; Stewart, G.C. (2002). Leukotoxins of gram-negative bacterias. *Vet Microbiol.* **84**, 337–356.

89. Neill, J.D.; Ridpath, J.F.; Valayudhan, V.T. (2015). Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. *BMC Vet Res.* **11**, 112.
90. Norström, M.; Eystein, S.; Jorun, J. (2000). Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. *Prev Vet Med.* **44**, 87-96.
91. NRC. National Research Council (1981). Effect of Environment on Nutrient Requirements of Domestic Animals. Consultado en: <http://www.nap.edu/catalog/4963.html>, consultado el 20/11/2018.
92. O'Connor, A.M.; Sorden, S.D.; Apley, M.D. (2005). Association between the existence of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus and commingling on pen morbidity in feedlot cattle. *AJVR.* **66** (12), 2130-2134.
93. Odeón, A.C.; Leunda, M.R.; Faverin, C.; Boynak, N.; Vena, M.M.; Zabal, O. (2009). In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Rev Med Vet.* **41**, 79-85.
94. Odeón, A. (2008). Enfermedad Respiratoria Bovina ¿Qué es posible hacer? Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Grupo de Sanidad Animal. En: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp\\_inta\\_enfermedad\\_respiratoria\\_bovina.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp_inta_enfermedad_respiratoria_bovina.pdf), consultado el 18/7/2018.
95. Odeón, A.C.; Späth, E.J.A.; Paloma, E.J., Leunda, M.R.; Fernández Sainz, I.J., Pérez, S.E.; Kaiser, G.G.; Draghi, M.G.; Cetrá, B.M.; Cano, A. (2001). Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev Med Vet.* **82**(4), 216-220.
96. Odeón, A.C.; Kelling, C.L.; Marshall, D.J.; Estela, E.S.; Dubovi, E.J.; Donis, R.O. (1999). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *Vet Diagn Invest.* **11**, 221-228.
97. OIE. (2012). Guía de prueba de potencia para vacunas bovinas que contengan en su formulación Virus Parainfluenza 3 Bovino (PI-3). En: [www.rr-americas.oie.int/wp.../10/Reg-Vac-002-Guia-de-Potencia-vacunas-PI-3.pdf](http://www.rr-americas.oie.int/wp.../10/Reg-Vac-002-Guia-de-Potencia-vacunas-PI-3.pdf), consultado el 15/2/2019.
98. OIE. (2018). Bovine Viral Diarrhoea. OIE Terrestrial Manual. En: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf), consultado el 7/4/2019.
99. Parreño, V.; Lopez, M.V.; Rodriguez, D.; Vena, M.V.; Izual, M.; Filippi, J.; Romera, A.; Faverin, C.; Bellinzoni, R.; Fernandez, F.; Marangunich, L. (2010a). Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus. *Vaccine.* **28**, 2539-2549.
93. Parreño, V.; Romera, S.A.; Makek, L.; Rodriguez, D.; Malacari, D.; Maidana, S.; Compaired, D.; Combessies, G.; Vena, M.M.; Garaicoechea, L.; Wigdorovitz, A.; Marangunich, L.; Fernandez, F. (2010b). Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. *J Virol Methods.* **169**, 143-153.
94. Pastoret, P.P.; Thiry, E.; Thomas, R. (1986). Logical Description of Bovine Herpesvirus Type 1 Latent Infection. *J Gen Virol.* **67**, 885-897.
95. Pastoret, P.P.; Thiry, E. (1985). Bovine and prophylaxis of infectious rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immun Microbiol Inject. Dis.* **8**(1), 35-47.

96. Patel, J.R. (2005). Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine* **23**, 4054–4061.
97. Pecora, A.; Malacari, D.A.; Perez Aguirreburualde, M.S.; Bellido, D.; Escribano, J.M.; Dus Santos, M.J.; Wigdorovitz, A. (2015). Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting. *Rev Argent Microbiol.* **47(1)**, 4-8.
98. Pecora, A.; Malacari, D.A.; Ridpath, J.F.; Perez Aguirreburualde, M.S.; Combessies, G.; Odeón, A.C.; Romera, S.A.; Golemba, M.D.; Wigdorovitz, A. (2014). First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res Vet Sci.* **96**, 204–212.
99. Perez Aguirreburualde, M.S. (2014a). Desarrollo y evaluación de herramientas biotecnológicas innovadoras para el control del virus de la Diarrea Viral Bovina en la provincia del Chubut. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
100. Pérez Aguirreburualde, M.S.; Apóstolo, R.; Pecora, A.; Raso, M.; Robles, C.; Dus Santos, M.J. (2014b). Primer reporte de detección de bovinos persistentemente infectados para el virus de la diarrea viral bovina en la provincia del Chubut, Argentina. Libro de Resúmenes del II Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinaria y Medicina Preventiva, pp 11.
101. Peters, A.R.; Thevasagayam, S.J.; Wiseman, A.; Salt, J.S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Prev Vet Med.* **66**, 63–77.
102. Piedrahita, D.; Ramirez, G.; Vera, V. (2005). Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpes Virus Bovino tipo 1. *Rev Med Vet Zoot.* **52**, 120-127.
103. Pinchak, W.E.; Tolleson, D.R.; McCloy, M.; Hunt, L.J.; Gill, R.J.; Ansley, R.J.; Bevers, S.J. (2004). Morbidity effects on productivity and profitability of stocker cattle grazing in the Southern Plains. *J Anim Sci.* **82**, 2773–2779.
104. Plan Ganadero de la provincia de Chubut. (2017). Ministerio de Producción de la Provincia de Chubut. En: [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/d\\_ovinos/informes/nacionales/archivos//000001\\_Chubut/000000\\_Plan%20Ganadero/000000\\_Plan%20Ganadero%20Chubut%202017.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/d_ovinos/informes/nacionales/archivos//000001_Chubut/000000_Plan%20Ganadero/000000_Plan%20Ganadero%20Chubut%202017.pdf), consultado el 25/7/2018.
105. Poe, K.D.; Beck, P.A.; Richeson, J.T.; Gadberry, M.S.; Kegley, E.B.; Hess, T.W.; Hubbell, D.S. (2013). Effects of respiratory vaccination timing and growth-promoting implant on health, performance, and immunity of high-risk, newly received stocker cattle. *Profes Ani Sci.* **29**, 413–419.
106. Pospizil, Z.; Krejci, J.; Jinek, P.; Lany, P.; Zendulkova, D.; Cihal, P. (1996). A development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Microbiol.* **53**, 199-206.
107. Reed, D.E.; Muench, H.A. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* **27**, 493.
108. Reinhardt, G.; Riedemann, S.; Ernst, S.; Aguilar, M.; Enriquez, R.; Gallardo, J. (1990). Seroprevalence of bovine viral diarrhea/ mucosal disease in southern Chile. *Prev Vet Med.* **10**, 73-78.

109. Ribble, C.S.; Meek, A.H.; Janzen, E.D.; Guichon, P.T.; Jim, G.K. (1995). Effect of time of year, weather, and the pattern of auction market sales on fatal fibrinous pneumonia (shipping fever) in calves in a large feedlot in Alberta (1985–1988). *Can J Vet Res.* **59**, 167-172.
110. Robles, C.; Fernandez, C.; Parreño, V.; Scodellari, G.; Echaide, I.; Cabrera, R.; Chodilef, M. (2015). Relevamiento sanitario en bovinos de una comunidad indígena de la provincia del Neuquén, Argentina. *Revista Veterinaria Argentina.* XXXII (322).
111. Robles, C. (2008). Relevamiento sanitario e implementación de un plan para la prevención y control de enfermedades en bovinos de productores rurales minifundistas comunitarios de la provincia de Neuquén, Argentina. San Carlos de Bariloche, INTA. Estación experimental Agropecuaria Bariloche, “Dr. Grenville Morris”. 39 p.
112. Romera, S.; Parreño, V., Maidana, S.; Echague, R.H.; Ferreccio, C.; García del Bo, S. (2017) Validación de elisa indirecto para evaluación de anticuerpos bovinos y de cobayo contra Virus Parainfluenza 3 Bovino (BPI3). Evaluación de seroprevalencia a Virus BPI3 en rodeos bovinos de la provincia de Buenos Aires. *Anuario de Investigación USAL.* **4**, 231-232.
113. Romera, S.A.; Puntel, M.; Quattrocchi, V.; Del Médico Zajac, P.; Zamorano, P.; Blanco Viera, J.; Carrillo, C.; Chowdhury, S.; Borca, M.V.; Sadir, A.M. (2014). Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. *BMC Vet. Res.* **10**, 8.
114. Romera, S.A.; Th Hilgers, L.A.; Puntel, M.; Zamorano, P.I.; Alcon, V.L.; Dus Santos, M.J.; Blanco Viera, J.; Borca, M.V.; Sadir, A.M. (2001). Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine.* **19**, 132-141.
115. Roshtkhari, F.; Mohammadi, G.; Mayameei, A. (2012). Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Trop Anim Health Prod.* **44**, 1105–1110.
116. Rossanigo, C.; Arano, A.; Rodríguez Vázquez, G. (2011). Stock 2011 del ganado bovino. Mapas de Existencias e indicadores ganaderos. En: <http://rian.inta.gov.ar/ganaderia/>, consultado el 20/3/2019.
117. Rossanigo, C.; Bengolea, A.; Sager, R. (2010). Patologías emergentes de intensificación bovina en la región semiárida-subhúmeda del centro de la Argentina. Informe Técnico N° 179, pp 28. Ediciones INTA.
118. Rossanigo, C.E.; Bengolea, A.; Sager, R.L. (2009). Enfermedades bovinas en los sistemas intensivos de la región semiárida-subhúmeda central. *Rev Arg Prod Ani.* **29(2)**, 151-160.
119. Rowe, H.A.; Poxton, I.R.; Donachie, W. (2001). Survival of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet Microbiol.* **81**, 305–314.
120. Rweyemamu, M.M.; Fernández, A.A.; Espinosa, A.M.; Schudel, A.A.; Lager, I.A.; Mueller, S.B.K. (1990). Incidence, epidemiology and control of bovine virus diarrhoea virus in South America. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* **9 (1)**, 207-214.
121. Salt, J.S.; Thevasagayam, S.J.; Wiseman, A.; Peter, A.R. (2007). Efficacy of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. *Vet J.* **174**, 616–626.
122. Sanderson, M.W.; Dargatz, D.A.; Wagner, B.A. (2008). Risk factors for initial respiratory disease in United States’ feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. *Can Vet J.* **49(4)**, 373-378.

123. SENASA. (2012). Resolución 598/12. Ref. Vacunas virales inactivadas no vesiculares para bovinos de uso veterinario - Autorización SENASA. 4/12/2012 (BO 12/12/2012).
124. Shake, L.M.; Webster, W.W.; Conway, R.C. (1980). Effect of origin and shopping distance on feedlot performance of cattle. *Beef Cattle Research in Texas*. 90-92.
125. SIPAN (2019). Sistema de Información Patagonia Norte. En: <http://sipan.inta.gov.ar/productos/ssd/vc/esquel/ig/clima.htm>, consultado el 20/3/2019.
126. SIS (2015). Sistema de Información Secundaria. Coordinación de Información Agropecuaria Nacional (CIAN). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). En: [sis-rian.inta.gov.ar/atlasito/ganaDos.aspx](http://sis-rian.inta.gov.ar/atlasito/ganaDos.aspx), consultado el 25/7/2018.
127. Smith, R.A. (1998). Impact of disease on feedlot performance: A review. *J Anim Sci*. **76**, 272-274.
128. Snowden, G. D.; van Vleck, L.D.; Cundiff, L.V.; Bennett, G.L. (2006). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci*. **84**, 1999-2008.
129. Späth, E. y Becker, B. (2012). Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. Grupo de Sanidad Animal 1997 al 2004. Boletín Técnico N° 160, pp 56. Ediciones INTA.
130. Spilki, F.R.; Esteves, P.A.; De Lima, M.; Franco, A.C.; Chiminazzo, C.; Flores, E.F.; Weiblen, R.; Driemeier, D.; Roehle, P.M. (2004). Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1(BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq Vet Bras*. **24(1)**, 43-49.
131. Step, D.L.; Krehbiel, C.R.; DePra, H.A.; Cranston, J.J., Fulton, R.W.; Kirkpatrick, J.G.; Gill, D.R.; Payton, M.E.; Montelongo, M.A.; Confer, A.W. (2008). Effects of commingling beef calves from different sources and weaning protocols during a forty-two-day receiving period on performance and bovine respiratory disease. *J Anim Sci*. **86**, 3146-3158.
132. Stilwell, G.; Matos, M.; Carolino, N.; Lima, M.S. (2008). Effect of a quadrivalent vaccine against respiratory virus on the incidence of respiratory disease in weaned beef calves. *Prev Vet Med*. **85**, 151-157.
133. Stott, E.J.; Thomas, L.H.; Collins, A.P.; Crouch, S.; Jebbett, J.; Smith, G.S.; Luther, P.D.; Caswell, R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg Camb*. **85**, 257-270.
134. Streitenberger, N.; Ferella, A.; Pérez Aguirreburualde, M.S.; Sammarruco, A.; Dus Santos, M.J.; Mozgovej, M.V.; Maidana, S.; Romera, S.A.; Pecora, A.; Quiroga, M.A.; Fazzio, L.E.(2017). Complejo respiratorio bovino: evidencia de circulación viral múltiple en un establecimiento de cría. *RIA*. **43(2)**, 149-155.
135. Suárez, V.H.; Bertoni, E.A.; Doderio, A.M.; Almudevar, F.M.; Salatin, A.O.; Viñabal, A.E.; Saldaño, R.; Olmos, L.H.1; Pereyra, W.R.; Brihuega, B.; Cortéz, H.S.; Parreño, V. (2018). Presencia de enfermedades en la cría bovina del dpto. Guachipas, Salta. *RIA*. **44(3)**, 367-377.
136. Taylor, J.D.; Fulton, R.W.; Lehenbauer, T.W.; Step, D.L.; Confer, A.W. (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors?. *Can Vet J*. **51(10)**, 1095-1102.
137. Thompson, P.N.; Stone, A.; Schultheiss, W.A. (2006). Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. *J Anim Sci*. **84**, 488-498.

138. Thomson, R.G.; Chander, S.; Savan, M.; Fox, M.L. (1975). Investigation of Factors of Probable Significance in the Pathogenesis of Pneumonic Pasteurellosis in Cattle. *Can J Comp Med.* **39**, 194-207.
139. Thomson, R.G.; Benson, M.L.; Savan, M. (1969). Pneumonic Pasteurellosis of Cattle: Microbiology and Immunology. *Can J Comp Med.* **33**, 194-206.
140. Tomlinson, M.S.; Hopker, A.; Corbishley, A. (2017). An outbreak of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in a herd vaccinated with a live glycoprotein E deleted (marker) bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) vaccine: lessons to be learned. *Vet Rec Case Rep.* 1-5.
141. Travería, G.E.; Alvarado Pinedo, M.F.; Sanabria, R.; Di Paolo, A.; Suzuki, K.; Romero, J.R. (2011). Estudio serológico en terneros de cría con infección natural de virus de IBR y BVD. *Rev Med Vet.* **92**, 26-32.
142. Van Donkersgoed, J., Ribble, C.S., Boyer, L., Townsend, H. (1993). Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res.* **57**, 247-254.
143. Van Donkersgoed, J.; van den Hurk, J.V.; McCartney, D.; Harland, R.J. (1991). Comparative serological responses in calves to eight commercial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses. *Can Vet J.* **32**, 727-733.
144. van Nieuwstadt, A.P.; Verhoeff, J. (1983). Epidemiology of BHV 1 virus infections in dairy herds. *J Hyg Camb.* **91**, 309-318.
145. Vilcek, S. (1994). Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses. *Vet Med (Praha).* **39(11)**, 687-700.
146. White, B.J.; Renter, D.G. (2009). Bayesian estimation of the performance of using clinical observations and harvest lung lesions for diagnosing bovine respiratory disease in post-weaned beef calves. *J Vet Diagn Invest.* **21**, 446-453.
147. Wittum, T.E.; Grotelueschen, D.M.; Brock, K.V.; Kvasnicka, W.G.; Floyd, J.G.; Kelling, C.L.; Odde, K.G. (2001). Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev Vet Med.* **49**, 83-94.
148. Yates, W.D.G.; Kingscote, B.F.; Bradley, J.A.; Mitchell, D. (1983). The Relationship of Serology and Nasal Microbiology to Pulmonary Lesions in Feedlot Cattle. *Can J Comp Med.* **47**, 375-378.
149. Yates, W.D.G. (1982). A Review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle. *Can J Comp Med.* **46**, 225-263.
150. Young, B.A. (1981). Cold Stress as it Affects Animal Production. *J Anim Sci.* **1(1)**, 154-163.
151. Zamit, A. L. (2010). Tecnologías de expresión en fagos para el estudio de epitopes de la proteína e2 del virus de la diarrea viral bovina doctorado, Universidad de Buenos Aires.
152. Zbrun, M.V.; Zielinski, G.C.; Piscitelli, H.C.; Descarga, C.; Urban, L.A. (2011) Dynamics of *Moraxella bovis* infection and humoral immune response to bovine herpes virus type 1 during a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. *J Vet Sci.* **12(4)**, 347-352.

**INDICE DE FIGURAS**

1. Esquema catastral y fluvial del Valle 16 de Octubre en relación a la provincia de Chubut y a la República Argentina.....	6
2. Ubicación de los establecimientos relevados dentro del Valle 16 de Octubre. (Elaboración propia: Quantum Gis1.8.).....	13
3. Toma de muestra de sangre para obtención de suero sanguíneo.....	15
4. Toma de muestra de secreciones nasales.....	16
5. Toma de muestra de secreciones oculares.....	16
6. Engorde a corral 1, terneros comiendo ración en comedero lineal bajo reparo.....	31
7. Engorde a corral 3, animales alimentados con balanceado comercial disponible en silo comedero de autoconsumo y heno de avena ofrecido.....	32
8. Recría con suplementación 1, animales alimentados con balanceado comercial disponible en silo comedero de autoconsumo.....	32
9. Recría con suplementación 2, con galpón de reparo para los terneros y lugar de suplementación con heno de alfalfa.....	32
10. Recría a corral 1, terneros alimentados con grano de cebada y núcleo proteico-mineral en comedero lineal de lona.....	33
11. Recría a corral 3, terneros alimentándose con silo bolsa con reja de autoconsumo....	33
12. Engorde a corral 2, materia fecal tipo 1 observada durante cuadro de acidosis clínica.....	37
13. Engorde a corral 2, animal de pie con flanco izquierdo distendido durante cuadro de acidosis clínica.....	38
14. Barro acumulado alrededor de las bocas de un comedero de autoconsumo en una recría con suplementación.....	41
15. Barro en la boca de una bolsa de silo con reja de autoconsumo.....	41
16. Animales con acumulación de agua sobre el pelaje.....	42
17. Dinámica de anticuerpos totales para BoHV1 en las 4 internadas serológicamente positivas para este virus.....	47
18. Animal 485 sin signos clínicos del que se aisló BoHV1 de secreción nasal.....	48
19. Animal 491 con conjuntivitis serosa del que se aisló BoHV1 de secreciones nasales y oculares.....	49
20. Dinámica de anticuerpos totales para BPI3V en las 9 internadas bajo estudio.....	55
21. Dinámica de anticuerpos totales para BVDV en las 9 internadas bajo estudio.....	62
22. Animal clasificado como caso clínico de CRB (ccCRB2) en RS1.....	74
23. Secreción nasal mucosa en caso clínico de CRB en Recría a corral (RC2).....	75
24. Dinámica de anticuerpos totales en cobayos contra BoHV1 detectados por ELISA indirecto al día 30 y día 60 posteriores a la aplicación de la primera dosis de vacuna inactivada conteniendo antígeno viral contra este virus.....	85

25. Dinámica de anticuerpos totales en cobayos contra BPI3V detectados por ELISA indirecto al día 30 y día 60 posteriores a la aplicación de la primera dosis de vacuna inactivada conteniendo antígeno viral contra este virus.....	85
26. Esquema de los diferentes momentos de vacunación y toma de muestras de suero de terneros.....	88
27. Dinámica de anticuerpos totales para BoHV1 bajo diferentes esquemas de vacunación en terneros de entre 6-8 meses.....	90
28. Dinámica de anticuerpos totales para BPI3V de diferentes esquemas de vacunación contra CRB en terneros de entre 6-8 meses.....	92

## INDICE DE TABLAS

1. Tipos de Invernadas en el Valle 16 de Octubre, provincia de Chubut.....	6
2. Establecimientos relevados: nombre, código de identificación, tipo de invernada, superficie total expresada en hectáreas y coordenadas geográficas.....	14
3. Cantidad, raza y peso promedio de los animales al ingreso en los establecimientos de invernada relevados.....	14
4. Edad promedio en días de los animales al ingreso a las invernadas en estudio y peso vivo promedio de los mismos.....	29
5. Presencia/Ausencia de factores generadores de estrés 30 días previos al inicio de la alimentación.....	30
6. Presencia/Ausencia de variables de manejo en las invernadas en estudio.....	31
7. Cantidad y porcentaje de invernadas en las que se observó circulación de BoHV1; BPI3V y BVDV y/o casos clínicos de CRB.....	44
8. Prevalencia serológica por invernada para BoHV1, BPI3V y BVDV a los días 0, 30 y 60 de muestreo.....	44
9. Prevalencia serológica por animal en terneros para BoHV-1, BPI3V y BVDV a los 0, 30 y 60 de muestreo.....	44
10. Prevalencia serológica, media geométrica, desvío estándar y rango de los títulos de anticuerpos totales para BoHV1 para cada invernada a los días 0, 30 y 60 de muestreo.....	46
11. Cantidad de animales que seroconvirtieron para BoHV1 entre las fechas de muestreo en las 4 invernadas donde se detectaron animales seropositivos.....	47
12. Aislamientos de BoHV1 en 2 invernadas. Identificación de la invernada y del animal del cual se obtuvo el aislamiento, tipo de aislamiento según secreción de la cual se aisló, momento de toma de muestra y presencia y tipo de signos clínicos presentes al momento de tomar las muestras.....	48
13. Títulos de anticuerpos totales para BoHV1 en los animales de los cuales se aisló el virus en alguna de las fechas de toma de muestreo.....	49
14. Prevalencia serológica, media geométrica, desvío estándar y rango de los títulos de anticuerpos totales para BPI3V para cada invernada a los días 0, 30 y 60 de	



muestreo.....	54
15. Cantidad de animales que seroconvirtieron para BPI3V entre las fechas de muestreo.	56
16. Aislamientos de BPI3V en 3 invernadas. Identificación de la invernada y del animal del cual se obtuvo el aislamiento, tipo de aislamiento según secreción de la cual se aisló, momento de toma de muestra y presencia de signos clínicos al momento de la toma de muestras.....	56
17. Títulos de anticuerpos totales para BPI3V en los animales de los cuales se aisló el virus en alguna de las fechas de toma de muestra.....	57
18. Prevalencia serológica, títulos promedios, desvío estándar e intervalo de confianza para BVDV en cada invernada y a los días 0, 30 y 60 de muestreo.....	61
19. Cantidad de animales que seroconvirtieron para BVDV entre las fechas de muestreo en las invernadas donde se detectaron animales seropositivos.....	63
20. Infecciones por uno ó más virus involucrados en el CRB en las 9 invernadas bajo estudio.....	66
21. Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Engorde a corral 2.....	71
22. Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de queratoconjuntivitis en la invernada identificada como Recría con suplementación 1.....	72
23. Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Recría con suplementación 1.....	73
24. Serología y aislamientos de BoHV1, BPI3V y BVDV en animales clasificados como casos clínicos y controles sanos durante un brote de CRB en la invernada identificada como Recría a corral 2.....	75
25. Título de anticuerpos totales en cobayos vacunados con vacuna experimental y comercial en dos momentos.....	84
26. Título de anticuerpos totales para BoHV1 en terneros de entre 6 y 8 meses de vida vacunados con vacuna experimental y comercial bajo diferentes esquemas de vacunación.....	90
27. Título de anticuerpos totales para BPI3V en terneros de entre 6 y 8 meses de vida vacunados con vacuna experimental y comercial bajo diferentes esquemas de vacunación.....	91

# **Anexos**

**ANEXO I****• Soluciones para ELISA indirecto****- Buffer carbonato o coating pH 9,6**

100 ml de agua destilada estéril

0,294 gr de bicarbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

0,156 gr de carbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )

Se llevó a pH 9,6 con ácido clorhídrico (HCl 5 N PM 35, Biopack)

Conservado a  $-20^\circ\text{C}$

**- Peróxido de Hidrógeno 10%**

50  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 100 vol (Biopack)

450  $\mu\text{l}$  de agua destilada

Conservado a  $4^\circ\text{C}$

**- Buffer citrato pH 5**

0,96 de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )

90 ml de agua bidestilada

Se llevó a pH 5 con hidróxido de sodio (HONa)

Conservado a  $-20^\circ\text{C}$

**- ABTS**

0,22 g de de 2'-azino-bis (3-etilbenziazoline-6-ácido sulfónico)

10 ml de buffer citrato pH 5

La solución lista para usar se conservó fraccionada en tubos eppendorff de 1,5 ml a  $-20^\circ\text{C}$ .

**- OPD**

100 ml de agua destilada

7,3 gr de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ( $141,96\text{g/mol}=514\text{ mM}$ )

4,7 gr de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) ( $192,13\text{ g/mol}= 243\text{ mM}$ ).

0,6 g de o-fenilendiamina (OPD).

pH de la solución alcanzó  $4,7 \pm 0,1$

Para obtener un cromógeno 1X se diluyó la preparación en agua destilada. Se agregaron 0,05 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 100 ml de OPD 1X

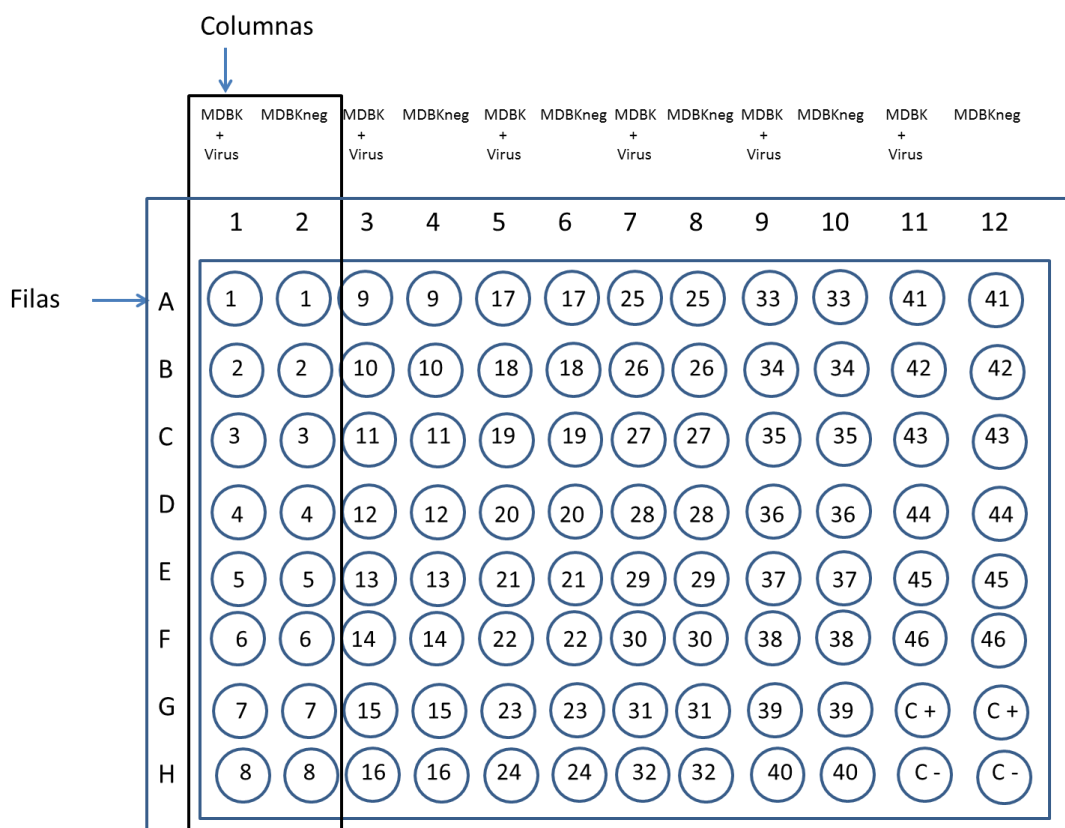
La solución lista para usar se conservó fraccionada en tubos eppendorff de 1,5 ml a -20°C.

- **Ácido Sulfúrico**

1 parte de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PM 95, Lab. Cicarelli) en 7 partes de agua destilada.

• **Diseños de placas**

- **ELISA indirecto de BoHV1 y BPI3V para prueba de screening**



**MDBK + Virus:** antígeno purificado preparado a partir de cultivos de células MDBK infectadas para BoHV-1 o BPI3V

**MDBKneg:** cultivos de células MDBK sin infectar

**1,2,3.....46:** Sueros problemas

**C +:** Suero control positivo

**C -:** Suero control negativo

- **ELISA indirecto de BoHV1 y BPI3V para titulación de sueros positivos**

	MDBK + Virus	MDBKneg	MDBK + Virus	MDBKneg	MDBK + Virus	MDBKneg	MDBK + Virus	MDBKneg	MDBK + Virus	MDBKneg	MDBK + Virus	MDBKneg
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1				
B	2	2	2	2	2	2	2	2				
C	3	3	3	3	3	3	3	3				
D	4	4	4	4	4	4	4	4				
E	5	5	5	5	5	5	5	5				
F	6	6	6	6	6	6	6	6				
G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+				
H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-				
Dilución	1/40		1/160		1/640		1/2560					
Log <sub>10</sub>	1,6		2,2		2,8		3,4					

**MDBK + Virus:** antígeno purificado preparado a partir de cultivos de células MDBK infectadas para BoHV-1 o BPI3V

**MDBKneg:** cultivos de células MDBK sin infectar

**1,2,3, 4 5 y 6:** Sueros problemas

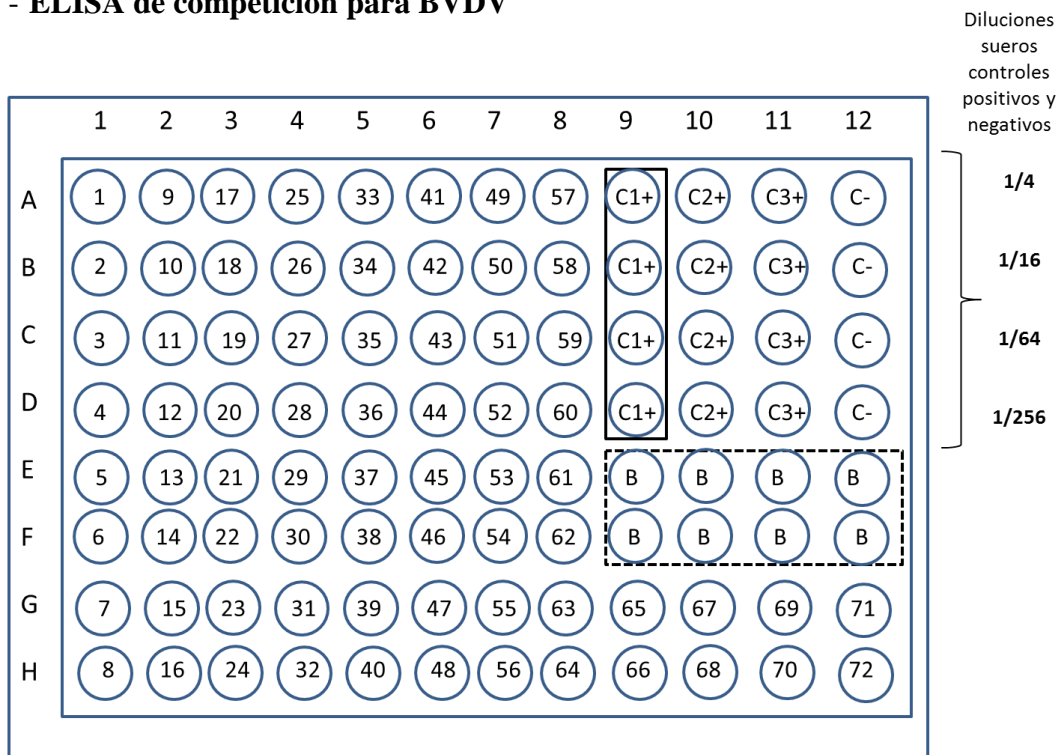
**C +:** Suero control positivo

**C -:** Suero control negativo

**Dilución:** Dilución de sueros problemas en PBS-T-OVA en base 40.

**Log<sub>10</sub>:** Expresión del valor recíproco de las diluciones de suero como logaritmo natural en base 10.

## - ELISA de competición para BVDV



**1,2,3,4....72:** Sueros Problemas

**C +:** Suero control positivo

**C -:** Suero control negativo

**Dilución:** Diluciones de 3 sueros controles positivos y 1 control negativo en base 4 en PBS-T 3%.

**B:** Pocillos blanco, sin agregado de sueros problema ni controles.

### • Soluciones PCR

#### - TBE

89 mM Tris(Tris-(hidoximetil)-aminometano)

89 mM ácido bórico

2 mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)

## ANEXO II

### • Encuesta

**ENCUESTA TRABAJO: Condiciones clínicas frecuentes en sistemas de recría e internada en el “Valle 16 de Octubre”, provincia del Chubut, con interés en los agentes virales involucrados el Complejo Respiratorio Bovino**

### I.- DATOS GENERALES DEL CAMPO

Establecimiento:

Ubicación:

Propietario:

#### Tipo de internada

	Recría a campo
	Recría con suplementación
	Recría a corral
	Engorde a corral

Cantidad de animales	
----------------------	--

Raza	Hereford		Angus		Careta	
------	----------	--	-------	--	--------	--

Peso promedio al ingreso		Extremos	
--------------------------	--	----------	--

Origen de los animales	1 campo		2 campos		3 o más campos	
------------------------	---------	--	----------	--	----------------	--

Trabajos con la hacienda 30 días del encierre	
	Destete
	Vacunación/Desparasitación
	Marcación/señalada
	Castración
	Transporte

Formación de lotes en función del peso	SI	NO
--	----	----

Fase preparatoria	
Duración (días)	

Manejo de la dieta				
Alimentación diaria	SI	NO	Cuántas veces por día	
Autoconsumo	SI	NO	Llenado (periodicidad)	

Dieta final						
Grano	%	Tipo	Cebada	Avena	Maíz	Otro
Alimento Balanceado	%	Tipo	Proteína	Energía	Digestib	Ca/P
Fibra	%	Tipo	De pastura	De alfalfa	Pellet de alfalfa	otro
Distribución de componentes	Mezclados		Separados	Orden		

Fuente de agua	Río	Pozo	Agua Corriente
Tipo de bebedero	Directo de fuente natural		Bebedero
Limpieza bebedero	SI	NO	Periodicidad en días

Zona de ubicación	Zona alta (loma)	Zona baja (valle)	Vera de río
Piso	Tierra	Piedra	Mallín-barro
Superficie potrero/corral	Superficie cubierta		



• **Lectura de materia fecal**

	<b>Tipo 1: Líquida</b>	<b>Tipo 2: Blanda</b>	<b>Tipo 3: Balanceada</b>	<b>Tipo 4: Firme</b>	<b>Tipo 5: Dura</b>
<b>Consistencia</b>	Acuosa	Pastosa	Papilla espesa	Espesa, secas	Dura, seca
<b>Forma</b>	Sin forma, planas	Expandida	Amontonada, redondeada en sus bordes. Con surcos y una depresión en el centro	Apilada en forma de torta cónica, formando anillos	Bolas o boñigas, con surcos muy marcados
<b>Disposición</b>	Extendidas, distribuida en varias secciones	Aprox 1 cm de altura, cae en un solo lugar	Aprox 2 a 3 cm de altura		Amontonada
<b>Indicación</b>	Acidosis clínica	Acidosis subclínica	Estado de salud IDEAL	Dieta con mucha fibra y poca energía o poca agua	Exceso de fibra, escasa energía

• **Lectura de comedero**

Recorrido de comederos previo a la entrega de comida, observación del remanente del alimento ofrecido con anterioridad y asignación de puntaje según escala predeterminada.

	<b>Grado 0</b>	<b>Grado 1</b>	<b>Grado 2</b>	<b>Grado 3</b>	<b>Grado 4</b>
<b>Remanente</b>	Comedero lamido	Menos 25%	Del 25 al 50%	Más del 50%	Alimento sin tocar
<b>Distribución</b>		En forma pareja en los comederos	Vacío en el centro y con comida en los costados		
<b>Indicación</b>	Falta alimento	IDEAL	Incomodidad en los comederos	Falta Materia seca	

• **Características de cada invernada**

- **Engorde a corral 1**

En EC1, la invernada formó parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. El campo de cría y el establecimiento donde se llevó a cabo la invernada distaban de 50 km. El destete se hizo de manera simultánea a la marcación de los terneros/as y a la administración de tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina para

control de parásitos redondos internos y parásitos externos y triclabendazole para control de *Fasciola hepática*. Inmediatamente posterior a estas actividades los terneros/as fueron trasladados en camión desde el campo de cría al establecimiento de invernada. A su llegada los animales permanecieron por 6 días en un potrero con pastizal natural diferido. Pasado ese tiempo se inició el engorde a corral con una dieta formulada con un 15% de alimento balanceado comercial y 85% de heno de pastura natural. El periodo de acostumbramiento a la nueva dieta duró 27 días y la dieta final fue de 90% alimento balanceado comercial y 10% heno de pastura natural. El alimento se ofreció dos veces por día. El corral contaba con reparo en la zona donde estaban los comederos.

#### - **Engorde a corral 2**

En EC2 la invernada formó parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. El campo de cría y el establecimiento donde se llevó a cabo la invernada distaban de 800 km. En el campo de cría el encierre de las vacas con sus terneros duró 3 días, debido a la extensa superficie del mismo. Inmediatamente posterior al encierre, los terneros fueron transportados en camión la distancia entre los dos establecimientos durante 18 hs. A su llegada los animales fueron alojados en un potrero con pastizal natural diferido. Tres días posteriores a su llegada se les administró tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina y triclabendazole y los machos se castraron con técnica de precinto (Apóstolo *et al.*, 2018). Dos días posteriores a estas prácticas los terneros fueron separados en 3 lotes en función al sexo y peso vivo y comenzaron su alimentación a corral con diferentes modalidades. Un lote se formó con 33 hembras, se les ofreció alimento balanceado comercial en silo comedero de autoconsumo junto con heno de avena ofrecido en comedero lineal. Otro lote estuvo constituido por 21 machos de hasta 150 kg y el tercer lote por 24 machos con pesos superiores a 150 kg. En ambos casos se les ofreció alimento balanceado comercial junto con heno de avena en comedero lineal. En el lote formado por las hembras, a los 2 días de iniciada la alimentación a corral se observó acidosis clínica en 17 animales. Los signos observados fueron anorexia, bosta tipo 1 (Figura 7) y problemas para desplazarse (Bavera y Peñafort, 2006). También se observó hinchazón del flanco izquierdo (Figura 8). Ante los casos, se suspendió la administración de alimento balanceado comercial, se ofreció solamente heno de avena y los animales afectados se trataron medicamente con dipirona (20mg/kgPV) vía intramuscular y bicarbonato de sodio (0,5gr/kgPV) diluido en agua al 4% vía oral. A los 5 días los animales afectados no presentaban síntomas de acidosis. En los 3 lotes y a partir de este episodio, se inició el acostumbramiento a la nueva dieta ofreciendo 80% de heno de avena y 20% de alimento balanceado comercial en comedero lineal dos veces

por día. El periodo de acostumbramiento a la nueva dieta duró 25 días y la dieta final fue de 80% alimento balanceado comercial y 20% heno de pastura natural. El reparo con el que contaban los corrales era de tipo natural y dado por un pinar.

- **Engorde corral 3**

En EC3 la invernada formó parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. La cría y la invernada tuvieron lugar en el mismo predio. El destete se hizo apartando las madres en un cuadro alejado del lugar de invernada. A los terneros se les administró tratamiento sanitario que incluyó albendazole para control de parásitos redondos internos y *Fasciola hepática*. Una vez destetados, quedaron alojados en un potrero con pastizal natural diferido. En ese mismo lugar, 10 días posteriores al destete, comenzó la alimentación con alimento balanceado comercial ofrecido en silo comedero de autoconsumo junto con heno de avena ofrecido de manera lineal sobre el suelo. Durante el período de acostumbramiento, el alimento balanceado estuvo disponible, mediante la apertura de las bocas del silo, por 1 hora durante la primera semana y luego se aumentó diariamente 1 hora. A partir de los 20 días de iniciado el acostumbramiento las bocas del silo permanecieron abiertas todo el día. Durante este período se les ofreció heno de pastura natural ad libitum.

- **Recría con suplementación 1**

En RS1, la invernada forma parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. La cría y la invernada tuvieron lugar en el mismo predio. El destete se hizo apartando las madres en un cuadro alejado del lugar de invernada. Los terneros quedaron alojados en un potrero con pastizal natural diferido. A 45 días del destete se comenzó con la suplementación a la dieta de pastura natural con alimento balanceado comercial ofrecido en silo comedero de autoconsumo. En ese mismo momento se aplicó tratamiento sanitario que incluyó ivermectina y triclabendazole.

- **Recría con suplementación 2**

La RS2 era un campo de invernada, con terneros provenientes de 2 campos de cría diferentes. No se contó con los datos de manejo en los campos de cría. El transporte fue a camión y el recorrido fue de aproximadamente 70 km desde el campo de cría. A su llegada al campo de invernada los terneros quedaron alojados en un cuadro con pastizal natural diferido. Al día posterior se les aplicó tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina y triclabendazole y los machos fueron castrados con la técnica de goma (Apóstolo *et al.*, 2018). A

15 días del ingreso a la invernada, se comenzó la suplementación de la dieta a base de pastura natural con heno de alfalfa ofrecido una vez al día en comederos lineales dentro de un galpón ubicado en un extremo del cuadro.

- **Recría con suplementación 3**

En RS3, la invernada formó parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. El campo de cría y el establecimiento donde se llevó a cabo la invernada distaban de 25 km. Los terneros se destetaron a camión en el campo de cría y fueron transportados la distancia entre los dos establecimientos (Figura 12). Los terneros fueron alojados en un potrero con pastizal natural de mallín. Siete días posteriores al ingreso se llevó a cabo el tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina y triclabendazole. Setenta y seis días posteriores al ingreso de los animales se comenzó con la suplementación a la dieta a base de pastura natural con alimento balanceado comercial ofrecido en silo comedero de autoconsumo y heno de pastura en rollo ofrecido entero contenido en porta rollo.

- **Recría a corral 1**

La RC1 era un campo de invernada con terneros provenientes de diferentes campos de cría. No se contó con los datos de la cantidad de campos de cría de origen ni del de manejo en los mismos. El transporte hacia la invernada fue a camión y el recorrido fue de aproximadamente 70 km. A su llegada los terneros quedaron en un corral alimentados con heno de pastura en rollos y ofrecido entero contenido en portarrollo. Siete días posteriores a la llegada se les aplicó tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina y triclabendazole y a la dieta se le sumaron 800 gr de grano de cebada y núcleo proteico-mineral por animal ofrecido en comedero lineal (Figura 12). El acostumbramiento duro 21 días, llegando a la dieta final de 2 kg de grano de cebada y núcleo proteico-mineral y rollo de pastura natural ad libitum.

- **Recría a corral 2**

En RC2, la invernada formó parte de un sistema de ciclo completo perteneciente al mismo propietario. El campo de cría y el establecimiento donde se llevó a cabo la invernada distaban de 110 km. Los terneros se destetaron a camión en el campo de cría y fueron transportados la distancia entre los dos establecimientos. A su llegada, los terneros fueron alojados en un potrero con pastizal natural. Treinta días posterior a su llegada se les aplicó tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial y triclabendazole e ingresaron a los corrales donde fueron alimentados con balanceado comercial ofrecido en silo comedero de

autoconsumo y rollo de heno de pastura natural ofrecido entero y contenido en portarrollos. El acostumbramiento se realizó mediante acceso limitado al comedero de autoconsumo y ofreciendo heno de pastura ad libitum para luego ir aumentando el tiempo de acceso al comedero. Desde el inicio del consumo de alimento balanceado y por un período de un mes, murieron 5 animales por acidosis.

### - Recría a corral 3

La RC3 era un campo de invernada con terneros provenientes de diferentes campos de cría. No se contó con los datos de la cantidad de campos de cría de origen ni del de manejo en los mismos. El transporte hacia la invernada fue a camión y el recorrido fue de aproximadamente 75 km. A su llegada los terneros quedaron en un corral alimentados con rollos de heno de pastura y ofrecido entero contenido en portarrollo. Diez días posteriores a la llegada se les aplicó tratamiento sanitario que incluyó vacuna anticlostridial, ivermectina y triclabendazole. A los 41 días del ingreso comenzaron a ser alimentados con silo bolsa de XXXXXX con rejas de autoconsumo (Figura 14).

### • Características de los potreros o corrales donde se desarrollaron las invernadas

	Sup Total (ha)	Sup Cubierta (m <sup>2</sup> )	Zona	Suelo
<b>EC1</b>	0,125	60	Valle	Piedra
<b>EC2</b>	0,3	0	Loma	Tierra
<b>EC3</b>	0,17	0	Loma	Tierra
<b>RS1</b>	40	Bosque	Loma	Tierra
<b>RS2</b>	8,2	400	Loma	Tierra
<b>RS3</b>	0,32	0	Valle	Mallín
<b>RC1</b>	2,5	0	Loma	Tierra
<b>RC2</b>			Loma	Tierra
<b>RC3</b>	1,6	0	Valle	Mallín

Zona: **Valle**, zona fría e inundable, propensa a formación de barro; **Loma**, zona alta, fría, seca.

Suelo: **Piedra**, mezcla de tierra/barro y ripio grueso, resultado de rellenar los corrales; **Tierra**: suelo seco y firme; **Mallín**: suelo húmedo y barroso.

- **Características de la alimentación y suministro de agua en cada invernada**

	Alimentación				Agua	
	Tipo	Frec	Acostum	Dieta final	Fuente	Entrega
<b>EC1</b>	Comedero lineal	2 veces x día	SI	85% Balanceado 15% Heno de pastura	Agua Corriente	Bebedero
<b>EC2</b>	Autoconsumo		NO	90% Balanceado 10% Heno pastura	Pozo	Bebedero
	Comedero lineal	3 veces x día	NO	80% Balanceado 20% Heno pastura		
<b>EC3</b>	Autoconsumo		SI	75% Balanceado 25% Heno de pastura	Pozo	Bebedero
<b>RS1</b>	Autoconsumo		SI	Balanceado	Canal	Directo
<b>RS2</b>	Comedero lineal	1 vez x día	SI	Heno de alfalfa	Canal	Directo
<b>RS3</b>	Comedero lineal	1 vez x día	SI	1 kg Balanceado	Arroyo	Directo
<b>RC1</b>	Comedero lineal	2 veces x día	SI	2 kg Cebada	Arroyo	Directo
<b>RC2</b>	Autoconsumo		NO	Balanceado	Pozo	Bebedero
<b>RC3</b>	Silo Bolsa		SI	Silo de avena-vicia	Arroyo	Directo

EC: engorde a corral; RS: recría con suplementación; RC: recría a corral.

Tipo: **Comedero lineal**: acorde a la cantidad de animales encerrados, con ofrecimiento diario de alimento; **Autoconsumo**: silos-comederos con bocas para XX animales, comida ad-libitum; **Silo Bolsa**: silaje de verdes y pasturas con superficie limitada de acceso, se corre la reja delante de la bolsa.

Acostumbramiento: tiempo para que se adecue la flora ruminal a nueva dieta energética.

- **Distribución de títulos de anticuerpos para BoHV1 (número de animales sobre el total de animales muestreados) a los días 0, 30 y 60 del inicio a cada invernada donde se detectaron animales seropositivos.**

Título de Anticuerpo para BoHV1 <sup>a</sup>		1,6	2,2	2,8	3,4
Invernada	Fecha de Muestreo				
<b>EC1</b>	0	2/15	0/15	0/15	0/15
	30	1/15	0/15	0/15	0/15
	60	0/15	0/15	0/15	0/15
<b>EC2</b>	0	3/15	0/15	0/15	0/15
	30	0/15	1/15	0/15	0/15
	60	0/14	1/14	0/14	0/14
<b>RS1</b>	0	1/13	3/13	0/13	0/13
	30	3/13	1/13	1/13	0/13
	60	3/13	2/13	1/13	0/13
<b>RS2</b>	0	0/15	1/15	0/15	0/15
	30	1/7	0/7	0/7	0/7
	60	0/10	0/10	0/10	0/10

EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación; 0: inicio de la invernada; 30: treinta días post-inicio 60: sesenta días post-inicio.

<sup>a</sup> Expresado como log<sub>10</sub>

- **Distribución de títulos de anticuerpos para BoPI3V (número de animales sobre el total de animales muestreados) a los días 0, 30 y 60 del inicio a cada invernada.**

<b>Título de Anticuerpo para BPI3V<sup>a</sup></b>		<b>1,6</b>	<b>2,2</b>	<b>2,8</b>	<b>3,4</b>
<b>Invernada</b>	<b>Fecha de Muestreo</b>				
<b>EC1</b>	<b>0</b>	4/14	2/14	1/14	0/14
	<b>30</b>	7/13	2/13	0/13	1/13
	<b>60</b>	0/14	6/14	8/14	0/14
<b>EC2</b>	<b>0</b>	2/12	1/12	1/12	2/12
	<b>30</b>	0/10	0/10	4/10	6/10
	<b>60</b>	0/9	0/9	7/9	2/9
<b>EC3</b>	<b>0</b>	6/14	8/14	0/14	0/14
	<b>30</b>	0/15	4/15	9/15	2/15
	<b>60</b>	0/15	4/15	11/15	0/15
<b>RS1</b>	<b>0</b>	1/13	3/13	6/13	2/13
	<b>30</b>	0/13	0/13	5/13	7/13
	<b>60</b>	0/13	0/13	2/13	11/13
<b>RS2</b>	<b>0</b>	6/14	1/14	1/14	0/14
	<b>30</b>	0/7	1/7	3/7	3/7
	<b>60</b>	0/10	0/10	7/10	3/10
<b>RS3</b>	<b>0</b>	3/14	2/14	7/14	1/14
	<b>30</b>	0/13	0/13	8/13	5/13
	<b>60</b>	0/10	0/10	6/10	4/10
<b>RC1</b>	<b>0</b>	0/5	0/5	10/15	5/15
	<b>30</b>	0/15	2/15	13/15	0/15
	<b>60</b>	0/15	4/15	6/15	5/15
<b>RC2</b>	<b>0</b>	1/15	3/15	9/15	1/15
	<b>30</b>	0/15	5/15	7/15	3/15
	<b>60</b>	0/10	3/10	4/10	3/10
<b>RC3</b>	<b>0</b>	1/15	3/15	6/15	3/15
	<b>30</b>	0/15	1/15	7/15	7/15
	<b>60</b>	0/14	0/14	5/14	9/14

EC: Engorde a corral, RS: Recría con suplementación y RC: Recría a corral; 0: inicio a la invernada; 30: treinta días post-inicio y 60: sesenta días post-inicio.

<sup>a</sup>Expresado como  $\log_{10}$

- Factores de riesgo y circulación de viral

Circulación viral		BoHV-1	BPI3V	BVDV
Variables de manejo				
<b>Tipo de Invernada</b>	OR	0,67	0,39	1,84
	IC	0,27-1,65	0,24-0,63	0,97-3,49
	P valor	0,3815	0,0001*	0,0615
<b>Destete</b>	OR	0,26	2,69	1,57
	IC	0,05-1,34	1,28-5,66	0,57-4,33
	P valor	0,1073	0,0093*	0,3826
<b>Transporte</b>	OR	0,41	2,30	2,72
	IC	0,08-2,05	1,11-4,78	0,99-7,49
	P valor	0,2792	0,0250*	0,0530
<b>Mezcla de animales de diferentes orígenes</b>	OR		0,81	23
	IC		0,37-1,76	6,09-86,92
	P valor		0,5941	0,00001*
<b>Formación de lotes</b>	OR	0,36	0,32	0,66
	IC	0,07-1,93	0,10-1,01	0,17-2,58
	P valor	0,2310	0,0515	0,5464
<b>Acostumbramiento</b>	OR	1,18	1	0,60
	IC	0,23-6,15	0,42-2,35	0,16-2,2
	P valor	0,8409	0,9917	0,4444
<b>Reparo</b>	OR	1,5	0,14	0,33
	IC	0,3-7,61	0,06-0,33	0,12-0,92
	P valor	0,6250	0,00001*	0,6250
<b>Acondicionamiento</b>	OR	0,26	2,69	1,57
	IC	0,05-1,34	1,28-5,66	0,57-4,33
	P valor	0,1073	0,0093*	0,3826

OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza del 95%; \*: hay asociación entre la circulación viral y las variables de manejo.



- **Vacuna Experimental**

**Etilenimina Binaria (BEI):**

Solución de OHNa 0.2N

0,235 gr de OHNa

29,5 ml de agua tridestilada

205 mg de 2-bromoetilamina (BEA) 0.1M para 10 ml de OHNa 0,2N.

Se mezcló en frasco color caramelo y se llevó a baño maría de 37°C por una hora agitando de manera manual cada 10 a 15 minutos.

La solución se filtró con filtro para jeringa estéril de acetato de 0,2 µm (Gamafil).

**Tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – 5H<sub>2</sub>O):**

2,482 gr de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

10 ml de agua tridestilada esteril

Se esterilizó a 1 atmósfera durante 20 minutos.

La solución resultante se filtró con filtro para jeringa estéril de acetato de 0,2 µm (Gamafil).

**Titulación de suspensiones virales para elaboración de vacuna experimental**

**Método de Reed y Muench**

La cuantificación viral de las suspensiones logradas a partir de la amplificación de aislamientos, se hizo a partir de la visualización de su actividad infectiva reflejada a través de su efecto citopático (ECP). El método se basa en la suposición de que el número de réplicas para cada virus (unidades de prueba) con ECP varía proporcionalmente al log<sub>10</sub> de la dilución, es decir que a diluciones menores (mayor concentración de virus) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de virus).

Para una determinación precisa se utilizó la zona correspondiente al 50% de ECP en las unidades de prueba. De esta manera el título de las suspensiones virales se expresó como Dosis Infectante de Cultivo Celular 50% (DICC<sub>50</sub>).

En el caso de BPI3V, en donde no se observó ninguna dilución con ECP del 50%, se recurrió a una interpolación matemática para cálculo de distancia proporcional entre diluciones.

**Tabla con las diluciones de la suspensión de BoHV1 (429 – 7° pasaje)**

Dilución	Log <sub>10</sub>	ECP Total	ECP	Sin ECP	Total ECP Acumulado	Total Sin ECP Acumulado	Relación	%
1:10	-1	4/4	4	0	22	0	22/22	100
1:100	-2	4/4	4	0	18	0	18/18	100
1:1000	-3	4/4	4	0	14	0	14/14	100
1:10000	-4	4/4	4	0	10	0	10/10	100
1:100000	-5	2/4	4	0	6	0	6/6	100
1:1000000	-6	2/4	2	2	2	2	2/4	50
1:10000000	-7	0/4	0	4	0	4	0/4	0

**Tabla de las diluciones de la suspensión de BPI3V (195 – 6° pasaje)**

Dilución	Log <sub>10</sub>	ECP Total	ECP 50	Sin ECP	Total ECP Acumulado	Total Sin ECP Acumulado	Relación	%
<b>1:10</b>	<b>-1</b>	4/4	4	0	27	0	27/27	100
<b>1:100</b>	<b>-2</b>	4/4	4	0	23	0	23/23	100
<b>1:1000</b>	<b>-3</b>	4/4	4	0	19	0	19/19	100
<b>1:10000</b>	<b>-4</b>	4/4	4	0	15	0	15/15	100
<b>1:100000</b>	<b>-5</b>	4/4	4	0	11	0	11/11	100
<b>1:1000000</b>	<b>-6</b>	4/4	4	0	7	0	7/7	100
<b>1:10000000</b>	<b>-7</b>	3/4	3	1	3	1	3/4	75
<b>1:100000000</b>	<b>-8</b>	0/4	0	4	0	5	0/5	0

Cálculo de distancia proporcional:  $\frac{\%>50-50\%}{\%>50-\%<50} = \frac{75-50}{75-25} = \frac{25}{50} = 0,33$

- Prueba de Potencia en vacunas

Puntos de corte para anticuerpos totales determinados por ELISA (expresados como  $\log_{10}$  de la inversa de la dilución de suero analizado que resulta positiva en el ensayo) para BoHV1 (Parreño *et al.*, 2010a)

Especie	Potencia de la vacuna para BoHV1		
	No satisfactoria	Satisfactoria	Muy Satisfactoria
COBAYO	$x < 1,93$	$1,93 \leq x \leq 3,02$	$x \geq 3,02$
BOVINO	$x < 1,69$	$1,69 \leq x \leq 2,72$	$x \geq 2,72$

Puntos de corte determinados como el  $\log_{10}$  del título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IHA) o unidades inhibitorias de la hemoaglutinación de glóbulos rojos de cobayos causada por el BPIV-3 presentes en el suero de cobayos y bovinos vacunados (Fundación PROSAIA, 2012).

Especie	Potencia de la vacuna para BPI3V		
	No satisfactoria	Satisfactoria	Muy Satisfactoria
COBAYO	$x < 1,50$	$1,50 \leq x \leq 2,4$	$x \geq 2,4$
BOVINO	$x < 2,8$	$2,8 \leq x \leq 3,1$	$x \geq 3,1$