

Estudio de la respuesta inmune frente a la vacunación con virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) inactivado en bovinos. Evaluación de la inmunidad pasiva

MARGINEDA, C.A.^{1,2}; FERELLA, A.⁵; PEREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.³; SAMMARRUCO, A.⁴; GONZALEZ, D.D.^{4,5}; TOLEDO, G.¹; DUS SANTOS, M.J.^{4,5}; MOZGOVOJ, M.^{4,5}

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el título y la duración de anticuerpos neutralizantes (AN) en vacas inmunizadas con una vacuna experimental inactivada para el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) y los niveles y la duración de los anticuerpos maternos anti-VRSB transferidos a través del calostro en los terneros nacidos. Se inoculó un grupo de seis vacas preñadas con una vacuna inactivada de VRSB 90 y 60 días antes del parto. El grupo control estaba formado por seis vacas sin vacunar. Se obtuvieron muestras de suero de las vacas a los días 90, 60, 30 antes del parto y 0, 60 y 120 días posteriores al parto. Con respecto a los terneros, se recolectaron muestras de suero de ambos grupos a las 48 horas posparto y 30, 60, 90 y 120 días luego del nacimiento. La detección de anticuerpos específicos contra el VRSB se realizó mediante seroneutralización viral. En los terneros se determinaron proteínas totales e inmunoglobulina G total a las 48 horas posparto. Solo las vacas vacunadas seroconvirtieron a los 60 días después del refuerzo y los títulos de anticuerpos permanecieron elevados 180 días después de este. Los terneros recién nacidos mostraron una transferencia pasiva efectiva de anticuerpos maternos específicos para el VRSB. En este trabajo fue posible corroborar la inducción y duración de los anticuerpos específicos contra el VRSB en vacas vacunadas con una vacuna inactivada así como en sus respectivos terneros.

Palabras clave: vacunación, virus respiratorio sincitial bovino, inmunidad pasiva.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the titer and duration of neutralizing antibodies in cows immunized with an inactivated experimental vaccine for BRSV and the levels and duration of anti-BRSV maternal antibodies in

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA), Marcos Juárez, ruta 12 km 3,5 (2580), Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. Correo electrónico: margineda.carlos@inta.gob.ar

²Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Enfermedades Infecciosas.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Patobiología, Nicolás Repetto y De los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Virología, Nicolás Repetto y De los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: mozgoj.marina@inta.gob.ar

⁵Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Virología, Nicolás Repetto y De los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, (CONICET). Correo electrónico: ferella.alejandra@inta.gob.ar

calves born. A group of six pregnant cows was inoculated with a inactivated BRSV vaccine, at 90 and 60 days before calving. As a control group, six animals were mock inoculated. Cows' serum samples were obtained at days 90, 60, 30 before calving and at 0, 60 and 120 days postpartum. Sera from calves were obtained at 48-72 hours postpartum, 30, 60, 90 and 120 days after birth. The kinetic of serum specific antibodies from inoculated animals and newborn calves was analyzed by a serum neutralization assay. Only the vaccinated cows seroconverted 60 days post booster and antibody titers remained high 180 days post booster. Six newborn calves showed an effective passive transfer of specific BRSV maternal antibodies. In this work, it was possible to determine antibody levels against BRSV and their duration after vaccination of cows and calves born using an inactivated vaccine.

Keywords: Vaccine, bovine respiratory syncytial virus, passive immunity.

INTRODUCCIÓN

El virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) es un neovirus de la familia *Pneumoviridae* altamente prevalente en el ganado bovino y uno de los agentes virales más importantes del complejo respiratorio bovino (CRB) (Brodersen, 2010; Van der Poel *et al.*, 1994). El BRSV se clasifica en 4 subgrupos antigénicos, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína G: A, B, AB y sin tipificar (Furze *et al.*, 1994). EL virus fue aislado por primera vez en Argentina en el año 1998 (Bagnis *et al.*, 1999). Estudios posteriores demostraron una alta prevalencia en bovinos de cría, tampo y feedlots de diferentes provincias de nuestro país (Ferella *et al.*, 2017; Odeón *et al.*, 2001). En infecciones naturales y experimentales con VRSB se ha demostrado que el virus puede inducir un cuadro clínico grave en animales menores de un año y afecta severamente a terneros de 0 a 3 meses de vida (Brodersen, 2010; Verhoef *et al.*, 1984; Viuff *et al.*, 1996). La infección por el VRSB causa daño y disfunción de las células del epitelio traqueo bronquial, bronquiolar y alveolar (Brodersen 2010; Viuff *et al.*, 1996). Es importante destacar que, si bien la infección por el VRSB ocurre aun en presencia de anticuerpos neutralizantes, estos anticuerpos se consideran protectivos debido a que en presencia de elevados títulos disminuye significativamente la severidad de la enfermedad (Van der Poel *et al.*, 1994; Belknap *et al.*; 1991; Kimman y Westenbrink, 1990).

Para la prevención de la enfermedad por el VRSB han sido utilizadas vacunas a virus completo inactivado (solo o combinado con otros agentes del CRB) o a virus vivo atenuado (Bowland y Shewen, 2000). En Argentina las vacunas comerciales utilizadas son a VRSB inactivo, y en todos los casos vienen combinadas con otros agentes que forman parte del CRB, como virus parainfluenza bovino tipo 3, herpesvirus bovino tipo 1, virus de la diarrea viral bovina, *Mannheimia haemolytica*, *Pasterurella multocida* e *Histophilus somni*.

Estudios de eficacia en los que terneros vacunados con vacunas a VRSB inactivado fueron infectados experimentalmente con cepas patógenas del VRSB, demostraron una disminución de la excreción viral conjuntamente con una

disminución en la severidad de las lesiones pulmonares (Ellis *et al.*, 2005). El rol de los anticuerpos maternos en la protección de los terneros jóvenes contra las infecciones con el VRSB fue controversial durante mucho tiempo. Primero se postuló que los anticuerpos calostrales anti-VRSB no protegían frente a la infección (Scott y Taylor, 1985). Posteriormente, Belknap *et al.* (1991) demostraron que terneros desafiados con el VRSB previamente alimentados con calostro proveniente de vacas vacunadas antes del parto, presentaban lesiones pulmonares menos graves comparados con terneros privados de calostro (Belknap *et al.*, 1991).

Una estrategia utilizada para mejorar la calidad inmunológica del calostro consiste en la vacunación de las madres en el parto (Gorden y Plummer, 2010). El volumen de calostro consumido tiene una relación directa sobre el título de anticuerpos en el ternero lactante; un menor consumo significará, en la mayoría de los casos, una menor concentración de IgG calostrales en el plasma del ternero (Quigley *et al.*, 1995). La información respecto a la duración de la inmunidad pasiva para el VRSB en terneros que calostean sin la intervención del hombre es escasa. Por un lado, la mayor parte de los estudios no detallan los niveles de inmunidad humoral en las vacas al momento del parto y, por otro lado, estos ensayos fueron realizados con suministro de calostro de manera artificial y alimentados en condiciones artificiales en terneros raza Holstein Friesians (Belknap *et al.*, 1991; Dudek *et al.*; 2014).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el título y la duración de anticuerpos neutralizantes (AN) en vacas inmunizadas con una vacuna experimental inactivada para el VRSB y los niveles y la duración de los anticuerpos específicos maternos anti-VRSB en los terneros nacidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron vacas y terneros del rodeo de cría de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez (INTA). El rodeo estaba constituido por 98 vacas raza

Aberdeen Angus (AA) y 3 toros raza Charolais (C). Se seleccionaron 12 vacas preñadas para el experimento y sus correspondientes terneros nacidos (filial 1; AA x C). Durante el experimento las vacas y sus terneros fueron aislados del resto del rodeo, alojados en potreros y alimentados con una pastura consociada de alfalfa y gramíneas. Los terneros nacidos calostraron y luego se alimentaron de leche materna hasta los 180 días posparto. Durante el ensayo, la condición corporal de las vacas fue monitoreada utilizando la escala de score corporal del 1-5. En los meses de parición (julio, agosto y septiembre) las vacas fueron monitoreadas 2 veces por día (7:00 h y 17:00 h) a fin de detectar los terneros nacidos.

Virus y células

Para los ensayos (producción de virus para la vacuna experimental y seroneutralización viral) se utilizó la cepa A51908 de VRSB, adquirida de ATCC, cedida por el Laboratorio de Virus Adventicios de INTA Castelar. Las células utilizadas para ambos ensayos fueron las Madin Darby bovine kidney (MDBK). Estas se cultivaron en una mezcla de partes iguales de E-MEM (Eagle's minimal essential medium) y D-MEM (Dulbecco's minimal essential medium) (GIBCO BRL) (1:1) con un 5% de suero fetal bovino libre de anticuerpos contra el VRSB.

Vacuna experimental

El inóculo contenía DICT50/ml dosis infectivas de cultivo de tejidos 50% (DICT50/ml). El título infeccioso de las producciones virales fue determinado por efecto citopático (ECP) mediante la metodología de Reed y Muench (1938). El VRSB (10^5 DICT50/ml) fue clarificado, luego se inactivó con *binary ethyleneimine* y se formuló en adyuvante oleoso incompleto (MONTANIDE ISA 50 V2, Seppic) en una relación 40% de antígeno y 60% de adyuvante.

Diseño experimental y vacunación de grupos experimentales

Se seleccionaron 12 vacas adultas preñadas, con un título de anticuerpos neutralizantes igual o inferior a 64 por seroneutralización viral, las cuales fueron divididas en dos grupos experimentales (6 vacas por grupo): grupo vacunado (GV) y grupo control (GC). Las vacas del grupo vacunado fueron inoculadas con 5 ml por la vía intramuscular en la tabla del cuello, con la vacuna de VRSB inactivo formulada en adyuvante oleoso. Las vacas del grupo control no fueron vacunadas. Los animales fueron inoculados 90 y 60 días antes del parto.

Recolección de muestras

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción de vena yugular usando tubos estériles sin anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rfc y los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su análisis. Los tiempos

de sangría en las vacas (GV y GC) fueron: 90 (T0), 60 (T1) y 30 (T2) días antes del parto, al parto (T3) y luego a los 60 (T4) y 120 (T5) días posparto.

Nacieron un total de 12 terneros; 7 terneros (2 fueron mellizos) fueron hijos del GV (TNGV) y 5 del GC (TNGC). Los tiempos de sangría en los terneros fueron: 48-72 horas posparto (T48pp), 1 (T1m), 2 (T2m), 3 (T3m) y 4 meses (T4m) luego del nacimiento.

Ensayo de seroneutralización viral

El ensayo de seroneutralización (SN) para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VRSB se basó en la técnica descrita por Samal *et al.* (1993). Se empleó el método suero variable-virus fijo, donde diluciones variables de sueros problema (seriada base 4) se enfrentaron a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50/ml). Brevemente, diferentes diluciones de sueros se realizaron en E-MEM: D-MEM y se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos. Luego en cada dilución de suero, se agregó un volumen de la dilución del virus de trabajo en una proporción 1:1. Las placas con la mezcla suero-virus se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂ y luego se trasvasaron 100 µl de dicha mezcla sobre una monocapa de células MDBK en placas de 96 pocillos. La lectura del ensayo se realizó por observación del ECP entre los 4-5 días posteriores a la infección. Se incluyó un control positivo fuerte, un control positivo débil, un control negativo (sueros de bovino), un control de células sin infectar y el control de la dilución del virus de trabajo. Las muestras se consideraron positivas cuando se observó la inhibición del ECP característico en una dilución determinada (título igual o mayor a 4). El título de anticuerpos neutralizantes se expresó como la inversa de la máxima dilución en la que no se observaba ECP.

Determinación de proteínas totales e inmunoglobulina G total

En las muestras de suero del tiempo T48pp de los terneros se realizó la determinación de proteínas totales (PrT) e inmunoglobulina G total (IgG). El ensayo de proteínas totales se realizó por el método de Biuret por espectrometría utilizando un kit comercial (Proti 2[®], laboratorio Wiener) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La determinación de IgG total se realizó con un ELISA desarrollado "in house". Brevemente, se produjo anticuerpo IgG ovino anti-IgG bovina el cual luego fue purificado por columna de afinidad utilizando resina de Sefarosa 4B activada con CNBr (GE Healthcare). Luego, se sensibilizaron placas Maxisorp fondo chato con el anticuerpo purificado (100 ng/pocillo) y diluido en buffer de pegado, se incubó 1 h a temperatura ambiente y se realizaron lavados con PBS-Tween (0,05%). Posteriormente se agregaron los sueros incógnita a cada pocillo, por duplicado y en diluciones 1/1000000 usando como diluyente PBS-Tween (0,05%). Luego, se agregó un anticuerpo comercial de ca-

bra anti IgG bovina conjugado con peroxidasa (Jakson) se incubó durante 1 h y se reveló con solución de ABTS. Los resultados fueron determinados por medio de una curva del tipo regresión logística de 4 parámetros (4PL), construida a partir de concentraciones conocidas (500 ng/ml – 0,68 ng/ml) de un suero de referencia bovino comercial (Bethyl, RS10-103).

Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante el software estadístico GraphPad Prism 7.04 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla California, EUA). Se presentaron las medias aritméticas y los errores estándar de AN, proteínas totales e IgG total. Las diferencias entre los valores de las medias de AN entre los grupos vacunados y grupo control (tanto en vacas como en los terneros nacidos) para cada tiempo se analizaron mediante t-Test. Un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo en todos los casos. Posteriormente, se realizó un análisis de ANOVA de dos vías (medidas repetidas en el tiempo) para evaluar el efecto de los tratamientos en promedio, y de observarse diferencias entre tratamientos, en caso de ser constante, se consideró un $p < 0,1$.

El ternero 26, nacido en el grupo de vacas vacunadas, se excluyó del análisis estadístico debido a que se corroboró que tuvo un calostrado deficiente 48 horas posparto.

RESULTADOS

El estado corporal de todas las vacas durante el periodo de ensayo estuvo comprendido entre 3,5 y 4 de score (datos no presentados en los resultados). Los resultados de SN viral en las vacas se muestran en la tabla 1. SSe consideró que un animal seroconvirtió cuando el título de AN había variado en un total de 2 diluciones base 4. Todas las vacas del grupo vacunado seroconvirtieron 60 días posteriores a la segunda vacunación ($p < 0,05$). Los títulos de anticuerpos alcanzaron niveles máximos 90 días después de la primera vacunación y luego comenzaron a disminuir. Sin embargo, la mayoría de los animales presentaron altos títulos (> 128) de anticuerpos al día 210. Ninguno de los animales del grupo control seroconvirtió durante el ensayo ($p > 0,05$), presentado niveles basales (8-64) de anticuerpos neutralizantes durante toda la experiencia.

Los niveles de proteínas totales e inmunoglobulinas G total a las 48 horas posparto y de AN anti-VRSB en los distintos tiempos de sangría de los terneros nacidos de ambos grupos, se muestran en la tabla 2. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales e IgG entre ambos grupos de terneros: terneros nacidos del GV (TNGV) y terneros nacidos de GC (TNGC). Es importante mencionar que las diferencias observadas en los títulos de anticuerpos entre los terneros número 24 y 26 se debieron a una falla en la transferencia pasiva de anticuerpos (FTP) en el ternero número 26.

Grupos experimentales	Vaca/N.º	Título de AN					
		T0 (1.ª Inoc.)	T1 (2.ª Inoc.)	T2	T3 (partos)	T4	T5
Grupo vacunado	1	64	512	512	512	512	512
	2	32	128	128	512	128	64
	3	16	16	32	512	64	32
	4	32	64	512	512	128	128
	5	16	32	64	128	64	64
	6	32	32	32	512	128	64
	X ± E.E.	32,0 ± 7,2	130,7 ± 78,0 a	213,3 ± 95,5 a	448,0 ± 64,0 a	170,7 ± 69,5 a	144,0 ± 74,7 a
Grupo control	15	16	32	64	32	16	16
	16	16	16	16	32	64	16
	17	8	8	16	16	16	16
	18	8	16	16	16	16	16
	19	32	16	64	64	64	32
	20	32	32	32	64	64	64
	X ± E.E.	18,7 ± 4,5	20,0 ± 4,0 b	34,7 ± 9,6 b	37,3 ± 8,9 b	40,0 ± 10,7 b	26,7 ± 7,9 b

Tabla 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes (AN) anti-VRSB en grupo de vacas vacunadas y control.

Letras diferentes (a y b) indica diferencias estadísticas significativas entre los grupos en cada tiempo, $p < 0,05$, t-test.

Grupos experimentales	Ternero/N.º	T48pp-Proteínas totales (g/dL)	T48pp-IgG (mg/mL)	Título de AN				
				T48pp	T 1m	T 2m	T 3m	T 4m
TNGV	24	6,82	32,76	64	64	32	16	4
	26*	5,13	6,83	8	16	4	8	4
	62	7,89	82,80	128	64	32	16	4
	68	7,07	111,20	128	128	16	68	16
	23	10,17	42,30	128	64	128	4	ND
	77	6,63	113,50	128	64	16	4	4
	64	10,41	34,90	128	32	16	8	2
	X ± E.E.	8,17 ± 0,70	69,58 ± 15,43	117,3 ± 13,7	69,3 ± 13,7 a	40,0 ± 13,7 a	19,3 ± 13,7	6,0 ± 2,5
TNGC	9	6,35	72,90	16	8	8	4	4
	46	6,9	19,20	128	8	4	ND	ND
	36	10,77	45,69	128	64	32	2	2
	63	6,22	64,20	32	8	4	4	ND
	41	8,44	56,90	128	128	16	16	4
	X ± E.E.	7,74 ± 0,85	51,78 ± 9,29	86,4 ± 15,0	43,2 ± 15,0 b	12,8 ± 15,0 b	6,5 ± 16,7	3,3 ± 0,7

Tabla 2. Proteínas totales, Inmunoglobulina G total y anticuerpos neutralizantes (AN) anti-VRSB en los terneros nacidos.

*ternero N.º 26 excluido del análisis estadístico debido a que se corroboró un calostrado deficiente. Letras diferentes (a y b) indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos en cada tiempo, p<0,05, t-test.

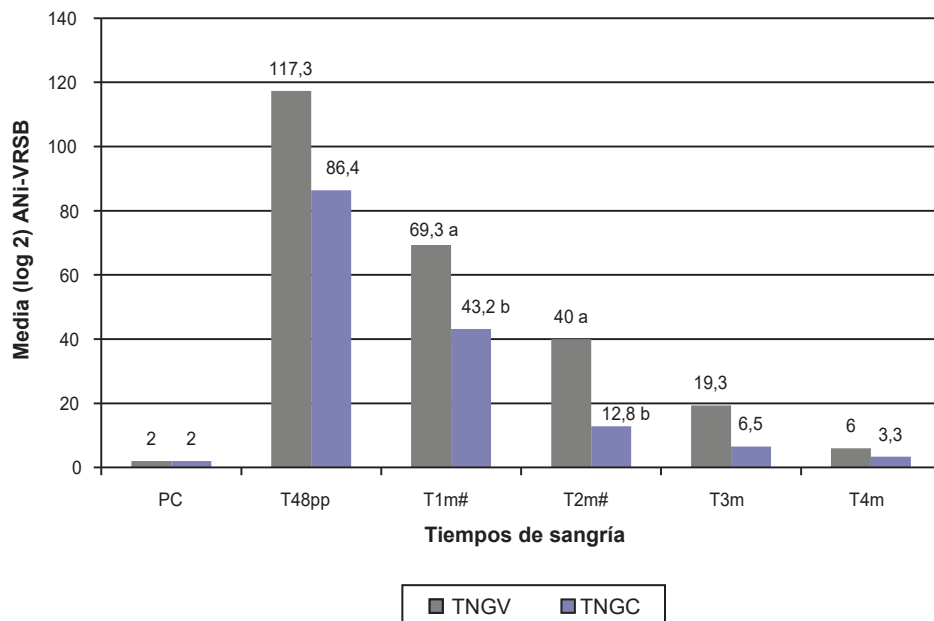


Figura 1. Título de anticuerpos neutralizantes (AN) anti-VRSB (medias) en terneros nacidos del grupo de vacas vacunadas (TNGV; barras grises) y del grupo de vacas control (TNGC; barras violetas). Las medias de anticuerpos fueron significativamente más altas en el T1m y T2m de los terneros del GV. La disminución fue más marcada en el GC. PC: precalostrado.

Los terneros nacidos del grupo de vacas control mostraron un aumento en los títulos de anticuerpos al nacer según los niveles basales de anticuerpos neutralizantes de sus respectivas vacas. Los títulos de anticuerpos maternos comenzaron a disminuir en el tiempo 60 en los terneros nacidos de vacas vacunadas ($p < 0,05$), mientras que en el grupo control los niveles de anticuerpos disminuyeron severamente, inmediatamente después del nacimiento ($p < 0,05$).

El análisis de medidas repetitivas demostró una diferencia promedio a lo largo del tiempo entre los 2 grupos experimentales ($p = 0,887$). A su vez, es importante resaltar la importancia que presenta la variabilidad de la respuesta humoral entre individuos de un mismo grupo en la justificación de la variación total del ensayo ($p = 0,908$). Estos resultados nos permiten afirmar que la curva de decaimiento de AN en los terneros nacidos de hembras vacunadas previamente al parto es diferente que la de los terneros de hembras no vacunadas que previamente habían tenido contacto con el agente viral (*no naïve*). No se pudo encontrar evidencia de correlación positiva entre los valores apareados de AN de cada hembra parto con los niveles de AN de cada ternero el primer día de vida ($p < 0,5$), dado, presumiblemente, por la alta variabilidad entre individuos y el número relativamente reducido de animales utilizado en este ensayo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron los niveles y la duración de anticuerpos maternos anti-VRSB en los terneros nacidos y se demuestra que la vacunación de las vacas en el parto con una vacuna experimental inactiva para el VRSB con 10^5 DICT50/ml es eficaz en estimular la respuesta inmune humoral, la cual es transferida vía calostro, a sus terneros. La inmunidad materna brindada por el calostro ingerido al nacimiento es esencial para prevenir las enfermedades entéricas y respiratorias en los primeros meses de vida del ternero (Hulbert *et al.*, 2016; Quigley *et al.*, 1995). Los intentos de protegerlos de infecciones alimentándolos con calostro de vacas vacunadas en el parto han sido exitosos en muchos casos (Belknap *et al.*, 1991; Makoschey *et al.*, 2012). Cabe mencionar que no solo es importante el título de anticuerpos inducidos por la vacunación, sino también la duración de estos. La inmunidad pasiva proporciona protección contra las enfermedades y es fundamental conocer cuándo descienden los anticuerpos maternos a fin de diseñar cronogramas de vacunación adecuados. En nuestro trabajo la duración de anticuerpos maternos anti-VRSB en los TNGV fue mayor comparado con los TNGC, declinando a los 60 posparto en los TNGV y a los 30 días en los TNGC.

Las infecciones respiratorias en bovinos ocurren frecuentemente en novillos en engorde a corral o terneros de guachera y recría en tambo (Brodersen, 2010). En establecimientos de cría el destete hiperprecoz (30 días de vida) es una situación de riesgo para las infecciones respiratorias virales (Gonzales *et al.*, 2013). Otra situación que hemos observado en los últimos años es la presentación de

infecciones respiratorias en terneros menores de 60 días de vida, sobre todo en rodeos de cría con un manejo intensivo. En el servicio de diagnóstico de la EEA Marcos Juárez (INTA) en el año 2015 tuvimos 2 brotes de CRB en campos de cría en terneros de 45 y 60 días de vida al pie de sus madres (información no publicada). Posiblemente, en la medida que se intensifiquen los campos de cría o se realice el destete hiperprecoz, las infecciones respiratorias podrían generar un alto impacto económico. La vacunación con agentes del CRB en parto podría ser una herramienta en los casos antes mencionados y por ello es importante realizar estudios relacionados con inmunidad calostrual en terneros de cría, ya que la mayor parte de los trabajos que evalúan la inmunidad calostrual se realizaron con terneros Holstein Friesians (Belknap *et al.*, 1991; Dudek *et al.*, 2014; Tunker y Yesilbag, 2015).

Los valores de AN anti-VRSB en los terneros de ambos grupos experimentales no fueron estadísticamente significativos a las 48 horas posparto. Esto no es coincidente con otros reportes (Dudek *et al.*, 2014; Belknap, *et al.*, 1991) donde sí observaron diferencias significativas en cuanto al nivel de anticuerpos en la primera semana de vida. Esta diferencia podría explicarse debido a que, en dichos trabajos, utilizaron como grupo control terneros alimentados con calostro proveniente de vacas seronegativas, en cambio en nuestro estudio el grupo de vacas control eran seropositivas, con niveles basales de anticuerpos ($16,0 \pm 3,6$). El hecho de haber utilizado vacas seropositivas para el GC en nuestro experimento fue lo que generó que sus terneros (TNGC) tengan AN anti-VRSB en sangre ($86,4 \pm 25,6$), incluso con niveles superiores al de sus madres al momento del parto ($34,0 \pm 8,9$).

La duración de los anticuerpos maternos en los terneros puede variar en función del estatus inmunológico de las madres y de la cantidad y calidad de calostro ingerido. Para el VRSB, IP3, DVB y HVB-1 se reporta que se requieren 6 meses o más para que los anticuerpos maternos no se detecten en circulación (Van der Pol *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2004). En nuestro trabajo evaluamos la cinética de anticuerpos hasta los 120 días posparto y observamos que la duración de los AN anti-VRSB maternos en terneros nacidos de vacas vacunadas permanecieron con diferencias estadísticamente significativas entre los terneros nacidos de los grupos GV y GC hasta los 60 días posparto. Dudek *et al.* (2014) realizaron estudios sobre la durabilidad de la inmunidad calostrual en terneros Holstein Friesians utilizando calostro de vacas vacunadas en el parto con vacunas comerciales inactivas de el VRSB, IP3, y *M haemolytica*. En dicho trabajo, los anticuerpos maternos anti-VRSB fueron significativamente más altos en los terneros nacidos de vacas vacunadas y permanecieron esas diferencias hasta incluso los 84 días de vida. A nuestro entender, las diferencias encontradas se podrían deber a diferentes condiciones experimentales ya que, Dudek *et al.* (2014) administraron a los terneros artificialmente calostro a razón de 2 litros por ternero durante 3 días consecutivos, mientras que en nuestro trabajo las condiciones de calostrado fueron naturales sin intervención del hombre. Otra explicación

es que las diferencias observadas podrían deberse a las diferentes metodologías utilizadas en la medición de anticuerpos. En el trabajo de Dudek *et al.* (2014) utilizaron un ELISA mientras que en este trabajo se utilizó la SN viral. Nuestra elección de utilizar la prueba de SN viral para medir anticuerpos se basó en el hecho de que los AN serían los responsables de neutralizar la partícula viral, otorgando protección frente a la infección. Estos anticuerpos son en su mayoría anticuerpos contra las proteínas F y G del VRSB y se consideran importantes en la inducción de la respuesta inmune (Kimman y Westenbrink, 1990). En cambio, la técnica de ELISA mide anticuerpos totales, sean o no neutralizantes, y a esto se podría deber la subestimación relativa de anticuerpos circulantes entre este reporte y los resultados de Dudek *et al.* (2014).

Estudios serológicos utilizando SN viral evaluaron la dinámica de infección de VRSB, IP3, HVB-1 y DVB en rodeos lecheros de Turquía y determinaron que los títulos de anticuerpos maternos para los diferentes virus declinaban a los 60 días de vida (Tunker y Yesilbag, 2015). Sin embargo, el valor de la media del título de anticuerpo contra el VRSB en los terneros a los 30 y 60 días fue marcadamente más alto a los observados en nuestro estudio. A diferencia de lo que sucedió en nuestra experiencia, en el trabajo de Tunker y Yesilbag (2015) observaron seroconversión durante el periodo de evaluación en los primeros meses de vida, además de que no tenían un grupo control. Por ello, es difícil saber, si dichos anticuerpos fueron producto de infección natural o inmunidad pasiva transferida por el calostro. La media del título de AN anti-VRSB en el tiempo T48pp de los terneros nacidos de madres vacunadas en nuestro estudio (117,3) fue similar a lo observado por Belknap *et al.* (1991) y Fulton *et al.* (2004).

En los sueros de los terneros a las 48 horas posparto no se observaron diferencias estadísticas significativas en los niveles de PrT e IgG de ambos grupos experimentales y lo mismo fue observado por Dudek *et al.* (2014). En nuestro estudio una de las vacas parió terneros mellizos y uno de ellos fue excluido del análisis estadístico debido a que se pudo constatar FTPA. El valor de PrT (5,13 g/dL) e IgG (6,83 mg/mL) en el ternero 26 estuvo por debajo de los valores de referencia (PrT: 6-8 g/dL y IgG: 10 mg/mL). Se observó con el análisis individual del ternero 26, que este tuvo diferencias importantes en los niveles de AN anti-VRSB comparado con el resto de los animales y esta diferencia fue debido a una FTPA. La FTPA en el ternero 26 podrían adjudicarse a dos causas, por un lado, que el ternero 26 fue el último en nacer y su madre ya no tenía el calostro suficiente o que, debido al parto prolongado de ambos mellizos, los niveles de absorción de IgG en el ternero 26 fueron bajos. Es reportado que los terneros que experimentan distocia o partos prolongados tienen más baja absorción de IgG1 de calostro debido a que experimentan acidosis respiratoria (Hulbert y Moisés, 2016).

Al igual que la vacuna utilizada en nuestro ensayo, todas las vacunas de VRSB vivas o inactivadas existentes en el mercado son productos con una sola cepa viral, y actualmente no hay suficiente información epidemiológica

sobre la virulencia y la prevalencia de las cepas de VRSB para considerar la inclusión de más de 1 cepa viral en una vacuna. De hecho, datos limitados sugieren que una vacuna combinada (subgrupo A más el subgrupo B) puede no ser necesario (Schrijver *et al.*, 1998). Los anticuerpos neutralizantes protectores están dirigidos contra la proteína F, la cual, es la proteína más conservada entre las diferentes cepas circulantes de VRSB. Cabe señalar que la clasificación de subgrupos VRSB se basa en unos pocos anticuerpos monoclonales contra las mutaciones puntuales de glicoproteína G (Furze *et al.*, 1994) y no hay suficiente datos disponibles para correlacionar la virulencia con la designación de cepa o subgrupo.

Basados en nuestros resultados, concluimos que los anticuerpos maternos aportados por el calostro de vacas vacunadas en el parto comienzan a declinar a los 60 días de vida. Luego, los títulos de anticuerpos descienden significativamente. En este sentido, podría recomendarse una primera vacunación de los terneros a los 2 meses de vida, en caso de que vacunen en el parto a las vacas, ya que los niveles de anticuerpos maternos no interferirían con la respuesta a la vacunación. Debido a la naturaleza de las vacunas inactivas, sería necesaria una segunda dosis entre los 21-30 días posteriores. Sin embargo, en este contexto de vacunación queda una ventana temporal en la cual los animales pueden presentar escasa inmunidad calostroal y todavía no desarrollaron inmunidad vacunal. Esto demuestra que, en conjunto con un plan vacunal racional, debe tenerse en cuenta un manejo integral de la sanidad del rodeo donde otras intervenciones busquen reducir el riesgo de infección (reducción de las maniobras estresantes). Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la necesidad de desarrollar nuevas vacunas capaces de aumentar los niveles y la duración de la inmunidad materna transferida por el calostro. Asimismo, resultaría interesante contar con vacunas que puedan ser aplicadas a los terneros, aun con altos títulos de anticuerpos maternos. Finalmente, consideramos importante revisar los cronogramas y estrategias de vacunación a fin de mejorar la inmunidad transferida a los terneros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los profesionales responsables del módulo de producción animal de la EEA Marcos Juárez (INTA); Andrés Kloster y Néstor Latimori y a los colaboradores en la realización de las tareas de campo; Miguel Ángel Mercado y Ariel Pérez. Este trabajo fue financiado con fondos del proyecto INTA-PNSA-1115054, INTA-PNBIO 1131034 y Fundación ArgenINTA.

BIBLIOGRAFÍA

- BAGNIS, G.; GIRAUDO, J.; SUTIL, S.; TORRES, C.; MARTIN, V.; RAVIOLO, J.; SAVORETTI, C.; SABINI, L.P. 1999. Aislamiento y detección antigénica del virus sincitial respiratorio bovino en la Argentina. *Rev Med Vet* 80 (3), 535-550.
- BELKNAP, E.B.; BAKER, J.C.; PATTERSON, J.S.; WALKER, R.D.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G. 1991. The role of passive im-

munity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *J Infect Dis* 163 (3), 470-6.

BOWLAND, S.L.; SHEWEN, P.E. 2000. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 41, 33-48.

BRODERCEN, B.W. 2010. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin Food Anim* 26, 323-333.

DUDEK, K.; BEDNAREK, D.; AYLING, R.D.; SZACAWA, E. 2014. Stimulation and analysis of the immune response in calves from vaccinated pregnant Cows. *Res Vet Sci* 97, 32-37.

ELLIS, J.A.; WEST, K.; WALDNER, C.; RHODES, C. 2005. Efficacy of a saponin-adjuvanted inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. *Can Vet J* 46, 155-162.

FERELLA, A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; MARGINEDA, C.; AZNAR, N.; SAMMARRUCO, A.; DUS SANTOS, M.J.; MOZGOVOJ, M. 2017. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in feedlot cattle from Córdoba and Santa Fe, Argentina. *Rev Argen Microbiol* 50 (3), 275-279.

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 diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV 1b, 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. FURZE, J.; WERTZ, G.; LERCH, R.; TAYLOR, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 75 (2): 363-70.

GONZALEZ, D.D.; VITTONI, J.S.; LADO, M.; BIOLATTO, A.; MOZGOVOJ, M.V.; FERELLA, A.; SAMMARRUCO, A.; MAIDANA, S.; ROMERA, A.; PARREÑO, V.G.; DUS SANTOS, M.J. 2013. Detection of antibodies against bovine herpes virus 1, bovine viral diarrhoea virus and bovine respiratory syncytial virus in early and ultra-early weaned beef calves. *Am J Anim Vet Sci* 8 (4): 210-219.

GORDEN, P.J.; PLUMMER, P. 2010. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Vet Clin Food Anim* 26, 243-259.

HULBERT, L.E.; MOISÁ S.J. 2016. Stress, immunity, and the management of calves. *J Dairy Sci* 99, 3199-3216.

HUSBAND, A.J.; LASCELLES, A.K. Antibody responses to neonatal immunization in calves. *Res Vet Sci* 1975; 18:201-7.

KIMMAN, T.G.; WESTENBRINK, F. 1990. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch Virol* 112, 1-25.

MAKOSCHEY, B.; RAMAGE, C.; REDDICK, D.; RNASER, S.; DONACHIE, W. 2012. Colostrum from cattle immunized with a vaccine based on iron regulated proteins of *Mannheimia haemolytica* confers partial protection. *Vaccine* 30, 969-973.

ODEÓN, A.C.; SPÄTH, E.J.A.; PALOMA, E.J.; LEUNDA, M.R.; FERNÁNDEZ SAINZ, I.J.; PÉREZ, S.E.; KÁISER, 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.

PATEL, J.R.; DIDLICK, S.A. 2004. Evaluation of efficacy of an inactivated vaccine against bovine respiratory syncytial virus in calves with maternal antibodies. *Am J Vet Res* 65 (4), 417-21.

QUIGLEY, J.D.; MARTIN, K.R.; BEMIS, B.A.; POTGIETER, L.N.D.; REINEMEYER, C.R.; ROHRBACH, B.W.; DOWLEN, H.H.; LAMAR, K.C. 1995. Effects of Housing and Colostrum Feeding on Serum Immunoglobulin, Growth, and Fecal Scores of Jersey Calves. *J Dairy Sci* 78 (4).

REED, L.J.; MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* 27: 493-97.

SAMAL, S.K.; MANOJ, K.P.; MACPHILLIPS, T.; CARMEL, D.K.; MOHANTY, S.B. 1993. Reliable confirmation of antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) by enzyme-linked immunosorbent assay using BRSV nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* 31 (12): 3147-52.

SCHRIJVER, R.S.; LANGEDIJK, J.P.; MIDDEL, W.G.; KRAMPS, J.A.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. 1998. A bovine respiratory syncytial virus strain with mutations in subgroup specific antigenic domains of the G protein induces partial heterologous protection in cattle. *Vet Microbiol* 63:159-175.

SCTOTT, E.J.; TAYLOR, G. 1985. Respiratory syncytial virus; brief review. *Arch. Virol.* 84: 1-52.

STOKKA, G.L. 2010. Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. *Vet Clin Food Anim* 26, 229-241.

TUNKER, P.; YESILBAG, K. 2015. Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves. *Vet Microb* 180,180-185.

VAN DER POEL, W.H.; BRAND, A.; KRAMPS, J.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. 1994. Respiratory syncytial virus infection in human beings and in cattle. *J Infect* 29, 215-228.

VAN DER POEL, W.H.; MIDDEL, W.G.; SCHUKKEN, Y.H. 1999. Antibody titer against bovine respiratory syncytial virus in colostrum-fed dairy calves born in various seasons. *Am J Vet Res* 60, 1098-1101.

VERHOEFF, J.; VAN DER BAN, M.; VAN NIEUWSTADT, A.P. 1984. Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and hematological findings. *Vet Rec.* 114, 9-12.

VIUFF, A.; UTTENTHAL, A.; TEGTMEIER, C.; ALEXANDERSEN, S. 1996. Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization. *Vet Pathol* 33:383-390.