

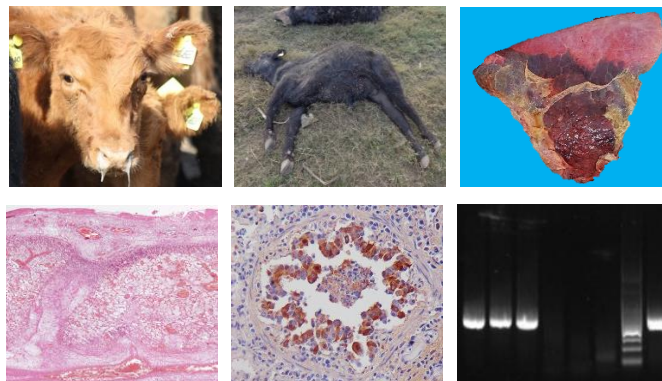
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



*Trabajo de Tesis realizado para optar por el título de*

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIOS CLÍNICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS  
DEL COMPLEJO ENFERMEDAD RESPIRATORIA BOVINA EN  
ENGORDE A CORRAL**



**Med. Vet. Streitenberger, Nicolás**

**Director:** Dr. Fazzio, Luis Emilio

**Director:** Dra. Quiroga, María Alejandra

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, FCV - UNLP

**Miembros del Jurado:**

Dra. Galosi, Cecilia M.

Dr. Minatel, Leonardo

Dra. Morrell, Eleonora L.

**Año 2020**

*A mis abuelas Inés y Olivia.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y la Universidad Nacional de La Plata, que permitió mi formación de grado y el desarrollo de este proyecto de tesis.

A mis directores María Alejandra Quiroga y Luis Emilio Fazzio por su apoyo y confianza a lo largo de este proyecto y por ser las personas que me dieron lugar en mis comienzos en las áreas de diagnóstico, docencia e investigación.

A todo el personal y dueños de los establecimientos de engorde a corral (ZENI y TAJSA) quienes fueron pilares fundamentales para la factibilidad de la tesis. En especial a Marce, Alberto, Juan, Manuel, Mauro, Leandro, Emanuel, Bernardo y Gerardo.

A María José Dus Santos de INTA Castelar por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí. Por su constante actitud proactiva y tiempo.

A Alejandra Ferella y María Sol Pérez Aguirreburualde por su ayuda incondicional durante toda la tesis. A las dos gracias es poco.

A Fernanda González, Maximiliano Jordan, Andrea Pecora y Marina Mozgovoj quienes colaboraron intensamente en el procesamiento de las muestras.

A mis amigos: Mariela Scrochi, Estefanía Pérez, Ramiro Rearte, Martín Bonamy y Joaquin Chiozza por compartir nuestras tesis, mates y charlas de ciencia.

A mi amigo Ramiro Rearte por su tiempo y dedicación en el análisis estadístico.

A mi familia, Alfredo, Liliana, Javier y Sebastián por confiar y apoyar mis decisiones y, alentar mi educación. En especial a mi hermano Sebastián por su

crítica constante en el lenguaje, la escritura y formación profesional. Pero también por ser amigo y cómplice. Por mates que duraron horas, gracias.

A Antonela Paladini por su incondicional ayuda y acompañamiento profesional y personal durante toda la tesis.

A Renzo, Tomás, Guido y Camila por su colaboración en la realización de las técnicas de inmunohistoquímicas (IHQ).

A Enrique Felix Costa y Walter Galván por enseñarme durante los muestreos.

A Carolina Zanuzzi por su ayuda desinteresada en la estandarización de las técnicas de inmunihistoquímica.

A mis compañeros de Patología Especial: Adriana, Mariana, Natalia, Gonzalo, Carolina, Inés, Romina, Nicolás y Ana por cubrir mis tareas los días de procesamiento de muestras.

A Carolina Aralda y Lorena Díaz por la ayuda en el área de histotecnología.

A Oscar Cáceres por su predisposición, ayuda y sinceridad.

A Silvina Maidana y Alejandra Romera por su colaboración en virología.

A Javier Cappuccio por su mirada crítica y alentadora en mis inicios como tesista.

A Carlos Perfumo por alentarme en el camino de la ciencia y su apoyo en mis decisiones profesionales. Por las charlas durante vacaciones en el laboratorio.

A los doctores Uzal y Morrell quienes facilitaron los controles de IHQ.

A Cecilia, Fito, Nadia y Carolina del Laboratorio de Virología de esta facultad por su colaboración en esta área.

## **PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS**

### **PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO**

1. Galván WR, Yacachury N, Costa EF, **Streitenberger N**, Quiroga MA, Fazzio LE. Causas de muerte en bovinos en engorde a corral en un establecimiento en la Provincia de Buenos Aires. Revista del Colegio de Veterinarias de la Provincia de Buenos Aires. 2014; 58: 54-59.
2. Fazzio LE, Giuliodori MJ, Galván WR, **Streitenberger N**, Landoni MF. A metaphylactic treatment with double dose oxytetracycline reduces the risk of bovine respiratory disease in feedlot calves. Rev. Vet. 2015; 26: 2.
3. **Streitenberger N**, Ferella A, Pérez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej MV, Maidana S, Romera SA, Pecora A, Quiroga MA, Fazzio LE. Complejo respiratorio bovino: evidencia de circulación viral múltiple en un establecimiento de cría. RIA. 2017; 43; 2: 149-155.
4. Galván WR, Arriaga GJ, **Streitenberger N**, Landoni MF, Fazzio LE. Efecto del tratamiento con florfenicol en el control de la enfermedad respiratoria bovina en engorde a corral. Rev. Med. Vet. 2019; 100, 2: 80-84.
5. Galarza EM, Lizarraga RM, **Streitenberger N**, Arriaga G, Abraham G, Mattioli GA, Anchordoquy JM, Fazzio LE. Assessment of Plasma Zinc and Total Leukocyte Count in Calves Experimentally Infected With Mannheimia Haemolytica. Biol Trace Elem Res. 2020; doi: 10.1007/s12011-020-02145-4.

## PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1. **Streitenberger N**, Fazzio LE, Costa EF, Galván W, Galarza E, Lobosco B, Murúa G, Quiroga MA. Estudio histopatológico de lesiones pulmonares en casos de complejo enfermedad respiratoria bovina. IX Reunión Argentina de patología Veterinaria y VIII° Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina, 2014, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

2. **Streitenberger N**. Estudios clínicos, anatomopatológicos y virológicos del Complejo Enfermedad Respiratoria Bovina en engorde a corral. Jornadas de Ciencia y Técnica, 2014, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

3. **Streitenberger N**, Ferella A, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej M, Maidana S, Romera A, Perez Aguirreburualde MS, Pecora A, Quiroga MA, Fazzio LE. Evaluación serológica de los agentes virales del complejo enfermedad respiratoria bovina en el período post destete en un rodeo de cría. VII Jornadas y reunión anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, 2014, Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina.

4. **Streitenberger N**, Ferella A, Perez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej M, Maidana S, Romera A, Pecora A, Quiroga MA, Fazzio LE. Complejo respiratorio bovino: estudio virológico longitudinal en un establecimiento de engorde a corral de la provincia de Buenos Aires, Argentina. XLIV Jornadas Uruguayas de Buatoría, 2016. Paysandú, Uruguay.

5. **Streitenberger N**, Ferella A, Mozgovej M, Dus Santos MJ, Pérez Aguirreburualde MS, Gonzalez F, Fazzio LE, Demarco R, Quiroga, MA. Primera detección de virus respiratorio sincicial bovino en bovinos de engorde a corral en

Argentina. XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria y XII Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina, 2018, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

6. Masnyj F, Margineda C, Descarga C, **Streitenberger N**, Quiroga MA. Neumonía intersticial atípica en vacas de un rodeo de cría del sur de Santa Fe. XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria y XII Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina, 2018, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

7. Demarco R, Quiroga MA, Fazzio LE, Abraham G, Gilead T, Negrelli PM, Rearte R, **Streitenberger, N**. Enfermedad respiratoria bovina: estudio anatomopatológico y detección de virus respiratorio sincitial bovino por inmunohistoquímica. VII Jornadas y reunión anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, 2019, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	XII
<b>TÍTULO: Estudios clínicos, anatomopatológicos y virológicos del complejo enfermedad respiratoria bovina en engorde a corral</b> .....	XV
<b>RESUMEN</b> .....	XV
<b>SUMMARY</b> .....	XVI
<b>CAPÍTULO 1: Revisión bibliográfica</b> .....	1
1.1 Engorde a corral en Argentina .....	1
1.2 Enfermedad respiratoria bovina (ERB) .....	3
1.3. Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) .....	7
1.4 Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) .....	13
1.5 Virus Parainfluenza-3 bovino (BPIV-3) .....	18
1.6 Alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1) .....	24
<b>CAPÍTULO 2: Enfermedad respiratoria bovina: estudio virológico longitudinal en establecimientos de engorde a corral de Argentina</b> .....	32
1.1 Objetivos .....	34
1.2 Hipótesis .....	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
2.1 Animales y establecimientos .....	35
2.2 Edad, sanidad, selección e identificación de los animales .....	38
2.3 Alimentación .....	38
2.4 Cronograma de muestreos .....	39
2.5 Evaluación clínica .....	41
2.6 Serología .....	44
2.6.1 Detección de anticuerpos para BRSV .....	45
2.6.2 Detección de anticuerpos para BVDV .....	46
2.6.3 Detección de anticuerpos para BPIV-3 .....	47
2.6.4 Detección de anticuerpos para BoHV1 .....	49
2.7 Aislamiento viral en cultivo de células (hisopados nasales) .....	52
2.8 Técnicas de diagnóstico molecular a partir de hisopados nasales de animales seroconvertidos .....	56
2.9 Criterio para considerar animales persistentemente infectados (PI) por BVDV .....	57
2.10 Aislamiento viral y técnicas de diagnóstico molecular en animales con ERB clínica .....	57
2.11 Análisis estadístico .....	58
3. RESULTADOS .....	59
3.1.1 Morbilidad y mortalidad .....	59



3.1.2 Hallazgos de necropsia y estudios complementarios .....	60
3.2 Serología .....	62
3.2.1 Serología BRSV .....	62
3.2.2 Serología BVDV 1a .....	66
3.2.3 Serología BVDV 1b .....	70
3.2.4 Serología BVDV 2 .....	74
3.2.5 Serología BPIV-3 .....	78
3.2.6 Serología BoHV1 .....	82
3.2.7 Seroconversiones .....	86
3.3 Virología .....	91
3.3.1 Aislamiento viral en cultivo de células (hisopados nasales T0, T15 y T30) 91	
3.3.2 Técnicas moleculares a partir de hisopados nasales de animales con conversión serológica .....	95
3.3.3 Animales persistentemente infectados para BVDV .....	99
3.3.4 Animales con ERB clínica .....	99
4. DISCUSIÓN .....	101
4.1 Incidencia .....	101
4.2 Diagnóstico clínico .....	103
4.3 Momento de presentación de ERB .....	104
4.4 Serología de los virus involucrados en ERB .....	105
4.4.1 Serología BRSV .....	105
4.4.2 Serología BVDV .....	107
4.4.3 Serología BPIV-3 .....	112
4.4.4 Serología BoHV1 .....	115
4.4.5 Infecciones virales múltiples detectadas mediante serología .....	118
4.5 Detección de los virus involucrados en ERB .....	119
4.5.1 BRSV: aislamiento viral y RT-nPCR a partir de sobrenadante de cultivo. 119	
4.5.2 BRSV: RT-nPCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos .....	120
4.5.3 BVDV: aislamiento viral y RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo.. 121	
4.5.4 BVDV: RT-PCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos .....	122
4.5.5 BVDV: genotipificación de BVDV .....	123
4.5.6 Animales persistentemente infectados para BVDV .....	124
4.5.7 BPIV-3: aislamiento viral y RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo. 126	
4.5.8 BPIV-3: RT-PCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos .....	126
4.5.9 BoHV1: aislamiento viral y PCR a partir de sobrenadante de cultivo .....	127
4.5.10 BoHV1: PCR a partir de hisopos nasales de animales seroconvertidos... 128	

4.5.11 Detección viral en animales con ERB clínica.....	129
5. CONCLUSIONES .....	132
<b>CAPÍTULO 3: Estudio anatomopatológico y virológico en bovinos de engorde a corral con lesiones de enfermedad respiratoria bovina .....</b>	<b>134</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	134
1.1 Objetivos.....	137
1.2 Hipótesis .....	138
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	139
2.1 Período de estudio, localización y principales características de los establecimientos y de los animales .....	139
2.2 Criterios de inclusión y de exclusión.....	140
2.3 Plan sanitario.....	140
2.4 Anamnesis e historia clínica de los casos .....	141
2.5 Estudios anatomopatológicos.....	141
2.5.1 Necropsia .....	142
2.5.2 Obtención de muestras para estudios complementarios.....	143
2.5.3 Histopatología .....	146
2.6 Estudios inmunohistoquímicos para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 .....	152
2.7 Técnicas de diagnóstico molecular para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 a partir de muestras de pulmón .....	154
2.8 Estudios microbiológicos.....	155
2.9 Diagnóstico final o causa de muerte.....	160
2.10 Análisis estadístico .....	161
3. RESULTADOS.....	161
3.1 Causa de muerte .....	161
3.2 Historial de tratamientos de los animales incorporados al estudio.....	162
3.3 Distribución de la mortalidad de los animales con lesión de ERB.....	162
3.4 Lesiones macroscópicas.....	165
3.5 Lesiones microscópicas .....	173
3.5.1 Lesiones microscópicas en pulmón .....	173
3.5.1.1 Bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS) .....	175
3.5.1.2 Bronconeumonía caseonecrotica (BCN).....	176
3.5.1.3 Neumonía intersticial (NI) y neumonía broncointersticial (NBI).....	176
3.5.1.4 Bronquitis y/o bronquiolitis.....	177
3.5.2 Lesiones microscópicas en tráquea.....	181
3.5.3 Lesiones microscópicas en linfonódulos traqueobronquiales .....	181
3.6 Detección de agentes virales (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1) .....	181
3.6.1 Detección de agentes virales a partir de muestras de pulmón .....	181

3.6.2 Detección de BoHV1 a partir de muestras de tráquea .....	190
3.7 Detección de agentes virales en función de las lesiones microscópicas .....	192
3.7.1 Distribución de la detección viral en función del patrón microscópico de lesión pulmonar .....	192
3.7.2 Detección de agentes virales en función de las lesiones bronquiolares .....	194
3.7.3 Detección de agentes virales en función del curso de la lesión pulmonar .....	197
3.8 Detección de agentes bacterianos a partir de muestras de pulmón.....	199
3.9 Coinfecciones .....	201
4. DISCUSIÓN .....	203
4.1 Epidemiología descriptiva e historial de tratamientos de los animales en estudio .....	203
4.2 Distribución de la mortalidad.....	204
4.3 Lesiones macroscópicas.....	206
4.4 Lesiones microscópicas .....	209
4.4.1 Pulmón.....	209
4.4.1.1 Bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS) .....	209
4.4.1.2 Bronconeumonía caseonecrótica (BCN).....	211
4.4.1.3 Neumonía intersticial (NI) y broncointersticial (NBI).....	212
4.4.1.4 Bronquitis y/o bronquiolitis (BB).....	214
4.4.1.5 Combinaciones de patrones de lesión pulmonar de ERB.....	214
4.5 Lesiones macroscópicas y microscópicas en tráquea .....	215
4.6 Detección de agentes virales (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1) .....	215
4.6.1 Detección viral a partir de muestras de pulmón .....	215
4.6.2 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el diagnóstico final.....	219
4.6.3 Detección de BoHV1 a partir de muestras de tráquea .....	220
4.6.4 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el patrón histopatológico de lesión pulmonar.....	221
4.6.5 Detección virales a partir de muestras de pulmón y su relación con las lesiones bronquiolares .....	223
4.6.6 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el curso de lesión pulmonar.....	225
4.7 Prevalencia de agentes bacterianos a partir de muestras de pulmón .....	226
4.8 Coinfecciones .....	229
5. CONCLUSIONES .....	230
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>232</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>2324</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>262</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**μl:** microlitro  
**μg:** microgramo  
**≥:** igual o mayor que  
**<:** menor que  
**≤:** igual o menor que  
**+:** positivo  
**-:** negativo  
**%:** porcentaje  
**°C:** grados Celsius  
**US\$:** dólares  
**ABTS:** azinodietilbenzotiazol-sulfonato  
**Ac:** anticuerpo/s  
**AcN:** anticuerpos neutralizantes  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**AV:** aislamiento viral  
**BAL:** lavado broncoalveolar  
**BALT:** tejido linfoide asociado a bronquios  
**BB:** bronquitis y/o bronquiolitis microscópica  
**BCN:** bronconeumonía caseonecrótica  
**BCOV:** coronavirus bovino  
**BFS:** bronconeumonía fibrinosupurativa  
**BN:** consolidación pulmonar craneoventral compatible con bronconeumonía  
**BoHV1:** alfaherpesvirus bovino 1  
**BO:** bronquiolitis obliterante  
**BPIV-3:** virus parainfluenza 3 bovino  
**Br:** pulmones con bronquitis y/o atelectasia lobulillar  
**BRSV:** virus respiratorio sincitial bovino  
**BVD:** diarrea viral bovina  
**BVDV:** virus de la diarrea viral bovina  
**BVDV 1a:** virus de la diarrea viral bovina genotipo 1a  
**BVDV 1b:** virus de la diarrea viral bovina genotipo 1b  
**BVDV 2:** virus de la diarrea viral bovina genotipo 2  
**CI:** cuerpos de inclusión  
**CICUAL:** Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio  
**Cit:** prueba de citrato  
**cm<sup>3</sup>:** centímetros cúbicos  
**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono  
**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato  
**DICT:** dosis infecciosas en cultivo de tejidos  
**DO:** densidad óptica  
**DOc:** densidad óptica corregida  
**DTT:** ditiotreitól

**ECP:** efecto citopatogénico  
**EC:** engorde a corral  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético  
**EE.UU:** Estados Unidos  
**E-MEM:** MEM de mantenimiento  
**ERB:** enfermedad respiratoria bovina  
**(F):** primer *forward*/sentido  
**g:** fuerza G de aceleración  
**G+:** Gram positivo  
**G-:** Gram negativo  
**Gram:** tinción de Gram  
**h:** horas  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno  
**HCl:** ácido clorhídrico  
**Hemol β:** beta hemólisis  
***H. somni:*** *Histophilus somni*  
**H&E:** hematoxilina y eosina  
**ID:** identificación  
**IHQ:** inmunohistoquímica  
**IHQ+PCR:** casos positivos a IHQ, PCR o a ambas técnicas  
**Indol:** prueba de indol  
**Kg:** kilogramos  
***K. pneumoniae:*** *Klebsiella pneumoniae*  
**Log<sub>10</sub>:** logaritmo en base 10  
**LONG:** estudio longitudinal prospectivo  
**M:** molar  
**m<sup>2</sup>:** metros cuadrados  
***M. bovis:*** *Mycoplasma bovis*  
**McK:** crecimiento en agar MacConkey  
**MDBK:** *Madin Darby Bovine Kidney cells*  
**mg:** miligramo/s  
***M. haemolytica:*** *Mannhemia haemolytica*  
**min:** minuto/s  
**ml:** mililitro  
**mM:** milimolar  
**M-MEM:** medio esencial mínimo  
**Móvil:** movilidad  
**n:** número  
**NaOH:** hidróxido de sodio  
**NB:** necrosis bronquiolar  
**NB+BO:** necrosis bronquiolar con bronquiolitis obliterante  
**NBI:** neumonía broncointersticial  
**NI:** neumonía intersticial  
**nm:** nanómetros  
**NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>:** prueba de reducción de nitratos a nitritos  
**O:** oeste  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** anión superóxido  
**Obj:** objetivo de aumento del microscópio

**OLB:** otra lesión bronquiolar  
**Oxi:** prueba de oxidasa  
**P:** pleuritis microscópica  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** solución *buffer* de fosfato  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PH:** potencial hidrógeno  
**PI:** animal persistentemente infectado por BVDV  
**PI:** pleuritis macroscópica sin lesión en parénquima pulmonar  
**PM:** peso molecular  
**pmol:** picomolar  
***P. multocida:*** *Pasteurella multocida*  
**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
**(R):** primer *reverse*/antisentido  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RT-PCR:** transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa  
**RT- *nested* PCR:** reacción en cadena de la polimerasa anidada  
**S:** sur  
**SC:** seroconversión  
**SDS:** dodecil sulfato de sodio  
**seg:** segundo/s  
**SFB:** suero fetal bovino  
**SLB:** sin lesión bronquiolar  
**SN:** seroneutralización  
**SPD:** sin posibilidad diagnóstica  
**T:** días de permanencia en el engorde a corral  
**T°:** temperatura corporal rectal  
***T. pyogenes:*** *Trueperella pyogenes*  
**U:** unidad(es) internacional(es)  
**UV:** ultravioleta

## **Estudios clínicos, anatomopatológicos y virológicos del complejo enfermedad respiratoria bovina en engorde a corral**

### **PALABRAS CLAVE**

Virus asociados a la enfermedad respiratoria bovina, serología, aislamiento viral, PCR e inmunohistoquímica.

### **RESUMEN**

Los objetivos del presente trabajo fueron, determinar la dinámica de infección y circulación de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en bovinos de engorde a corral (EC) durante los primeros 60 días de encierre y evaluar la presencia de antígenos y ácidos nucleicos virales en pulmones con lesiones de enfermedad respiratoria bovina (ERB) a la necropsia. Para el primer objetivo se llevaron a cabo tres estudios longitudinales prospectivos (LONG) en los que se realizaron técnicas moleculares y de aislamiento viral a partir de muestras de hisopados nasales y serología seriada. Para evaluar el segundo objetivo se incluyeron muestras de pulmón con lesiones anatomopatológicas de ERB y se realizaron técnicas moleculares y de inmunohistoquímica para detección viral. En los estudios LONG, los mayores valores de seroconversión fueron 80%, 73%, 60%, 67%, 51% y 60% para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 respectivamente; y todos estos virus fueron detectados, a partir de hisopados nasales, por técnicas moleculares. En animales con ERB clínica (n=6) se detectó BRSV, BVDV, BPIV-3 o combinación de ellos. En los pulmones con lesiones compatibles con ERB, se identificaron los cuatro virus estudiados mediante técnicas moleculares y/o IHQ con porcentajes de detección del 14%,

11%, 16% y 5% para BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 respectivamente; mientras que los patrones de lesión pulmonar más frecuentes fueron bronconeumonía fibrinosupurativa y neumonía intersticial. El 23% de los animales con lesiones de ERB presentaron coinfecciones viral y bacteriana. Los resultados de los estudios LONG evidencian circulación de los cuatro virus evaluados en animales con infecciones clínicas y subclínicas de ERB. Las infecciones virales múltiples fueron muy frecuentes y sugieren sinergismo entre los virus. La detección de BRSV, BPIV-3, BoHV1 y BVDV en pulmones de animales de EC con lesiones compatibles con ERB, mediante IHQ y PCR confirmó la asociación entre la presencia viral y el desarrollo de lesión.

## **Clinical, pathological and virological studies of the bovine respiratory disease complex in feedlot cattle**

### **KEY WORDS**

Viruses associated with bovine respiratory disease, serology, viral isolation, PCR and immunohistochemistry.

### **SUMMARY**

The aims of this thesis were to determine the dynamics of infection and circulation of BRSV, BVDV, BPIV-3 and BoHV1 in feedlot cattle during the first 60 days after arrival and to evaluate the presence of viral antigens and nucleic acids in lung lesions compatible with bovine respiratory disease (BRD) at autopsy. For the first aim, three prospective longitudinal (LONG) studies were



carried out in which serial serology was performed as well as molecular and viral isolation techniques from nasal swab samples. To evaluate pathological lesions, lung samples with BRD lesions were included and molecular and immunohistochemical techniques were performed for viral detection. In the LONG studies, the highest seroconversion values were 80%, 73%, 60%, 67%, 51%, and 60% for BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3, and BoHV1 respectively. All viruses studied were detected from nasal swabs by molecular techniques. BRSV, BVDV, BPIV-3 or a combination of them were detected in animals with clinical BRD (n=6). In lungs, detection by molecular techniques and/or IHC were as follows: 14% (BRSV), 11% (BVDV), 16% (BPIV-3) and 5% (BoHV1). The most frequent lung injury patterns were fibrinosuppurative bronchopneumonia and interstitial pneumonia. Viral and bacterial coinfections were present in 23% of the animals with BRD lesions. The results of the LONG studies show circulation of the four viruses studied in animals with clinical and subclinical BRD infections. Multiple viral infections were very frequent and suggest synergism among these viruses. BRSV, BPIV-3, BoHV1 and BVDV were detected in lungs of feedlot cattle with BRD-associated lesions, using IHC and PCR. This confirmed the association between viral presence and lesion development.

## **CAPÍTULO 1**

### **Revisión bibliográfica**

#### **1.1 Engorde a corral en Argentina**

##### **1.1.1 Importancia del sistema productivo e impacto de las enfermedades**

La producción bovina en Argentina, históricamente, se ha desarrollado sobre sistemas productivos extensivos. En las últimas décadas, el avance de la agricultura ha llevado a que la ganadería haya cedido las mejores tierras, circunscribiendo su desarrollo a superficies reducidas y en establecimientos de menor producción en cantidad y calidad de forraje (Antuña y col., 2011). Lo expuesto obligó a relocalizar la ganadería, especialmente en la etapa de recría y terminación (Dana, 2013). El engorde a corral (EC) surgió como un complemento para aumentar la receptividad de los establecimientos e incrementar la productividad. En la actualidad, la producción bovina en sistemas de EC es una actividad consolidada y en expansión. En los últimos 25 años se ha observado un incremento tanto en el número de establecimientos como en sus existencias ganaderas, siendo las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba las que registran el mayor número de establecimientos y la mayor concentración de ganado (MAGyP, 2017).

Un informe reciente señala que, del total nacional de hacienda bovina enviada a faena, el 24,6% tuvo origen en establecimientos de EC, correspondiendo en su mayoría (87,2%) a las categorías novillos y vaquillonas

(MAGyP Informe faena, 2018). La alta densidad animal y la alimentación basada en el uso de concentrados, a fin de lograr una alta conversión alimenticia, son las principales características de este sistema de producción. En Argentina esta actividad está destinada principalmente a bovinos jóvenes, provenientes de destete precoz (80 a 100 días de vida) o de destete convencional (6 a 7 meses) que permanecen en engorde hasta llegar a su peso de faena. El tiempo de permanencia en estos sistemas intensivos varía, por lo general de 60 a 90 días o bien de 4 a 6 meses dependiendo del peso de ingreso.

### **1.1.2 Impacto de las enfermedades**

Las enfermedades que afectan a los bovinos de EC pueden tener un impacto productivo significativo. Por lo tanto, lograr un adecuado nivel sanitario resulta uno de los pilares para alcanzar el peso de faena en los tiempos previstos, obtener una res de calidad y, por ende, una mayor rentabilidad. Si bien los problemas sanitarios identificados no constituyen enfermedades o entidades nuevas, en este sistema se presentan en forma diferente en cuanto a incidencia, prevalencia y tasa de contagio, consecuencia de los altos niveles de contacto (Costa y col., 2003, Lopes Baptista y col., 2017). Las enfermedades transmisibles -principalmente respiratorias y digestivas- y aquellas, resultado de un mal manejo nutricional, son las causas más frecuentes de pérdidas productivas en el EC (Costa y col., 2003; Rossanigo, 2009; Lopes Baptista y col., 2017; Galván y col., 2019).

Sobre esta base, no sólo las presentaciones clínicas que cursan con enfermedad y/o mortandad deben ser tenidas en cuenta, sino también aquellas enfermedades que se desarrollan de forma subclínica (Costa y col., 2003). Estas

últimas impactan negativamente en los índices productivos al generar menor ganancia diaria de peso, aumento en los días en llegar al peso de faena y menor calidad de carcasa (Costa y col., 2003; Cusack y col., 2007; Caswell y col., 2012; Lopes Baptista y col., 2017).

En este contexto, el reconocimiento temprano de enfermedad es prioritario para su adecuado manejo. Y si bien resulta relevante identificar y reconocer los procesos morbosos una vez establecidos, también reviste importancia la capacidad de anticiparse a las enfermedades mediante un manejo sanitario preventivo, de modo tal de poder reducir el impacto económico que las enfermedades provocan.

En Argentina, la tasa de mortalidad de los sistemas de EC varía según la región y ronda entre 1 y 2% por ciclo de engorde (Giraud y Magnano, 2008). La mayoría de las pérdidas por enfermedades y muertes se producen durante los primeros 30 días de encierre y la mortandad en este período varía entre el 0,2 y el 0,8% (Costa 2005).

## **1.2 Enfermedad respiratoria bovina (ERB)**

Entre las enfermedades que afectan a los bovinos en EC, la ERB es una de las más frecuentes (Panciera y Confer, 2010) y se da principalmente al comienzo de la etapa de engorde (Costa y col., 2003; Galván y col., 2019).

La morbilidad de esta enfermedad en EC varía entre el 6 y el 67% (Martin y col., 1989; USDA, 2011; Lopes Baptista y col., 2017), mientras que la mortalidad varía entre el 0,7% y el 10% (Booker y col., 2008; Fulton y col., 2009). Estudios realizados en un EC canadiense, mostraron que entre el 10 y el

30% de los animales que provenían de un mercado concentrador debieron recibir tratamiento por padecer ERB (Booker y col., 2008).

La ERB se ve favorecida por diferentes factores considerados de riesgo tales como viajes prolongados, gran densidad animal, mezcla de animales de diferentes orígenes, pasaje de los animales por un mercado concentrador, cambios de alimentación, inclemencias climáticas, gran número de cabezas en el establecimiento, bajo peso corporal al ingreso y la reorganización social del grupo que comparte el nuevo hábitat -corral- (Martin y col., 1989; Cusack y col., 2003; Taylor y col., 2010; Moore y col., 2015).

La ERB es de causa multifactorial, siendo resultado de la interacción entre agentes infecciosos (virus, bacterias y micoplasmas), ambiente, manejo (estrés) y factores ligados al hospedador -susceptibilidad individual- (Caswell y col., 2012). Todos estos factores y agentes, así como la sinergia que existe entre ellos, contribuyen en la patogénesis, severidad y frecuencia de la ERB (Radostits y col., 2007; Grissett y col., 2015) y resultan los pilares sobre los que deberían tomar base los programas sanitarios de prevención y control (Radostits y col., 2007).

Los signos clínicos de ERB dependen del estadio de enfermedad del animal. En los estadios iniciales se observa moderada depresión sensorial, vientre sumido e hipertermia ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ). En un curso de enfermedad algo más avanzado, hipertermia, depresión marcada, disnea y descarga nasal y/o ocular. Finalmente, en los estadios crónicos se suman, además, el decúbito y la escasa respuesta a estímulos (Hanzlicek y col., 2010).

Si bien la ERB acarrea importantes consecuencias económicas (Fulton y Confer, 2012; Lopes Baptista y col., 2017), estas no han sido lo suficientemente evaluadas bajo las condiciones en que se desarrollan los sistemas de producción en Argentina, no conociéndose las pérdidas reales que ocasiona.

### **1.2.1 Agentes virales involucrados en la ERB**

Entre los agentes virales más frecuentemente descriptos se destacan: virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus parainfluenza 3 bovino (BPIV-3), alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1) y virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Todos ellos producen alteraciones de los mecanismos de defensa del aparato respiratorio (Ackermann y col., 2010). En algunos estudios se ha incluido también al coronavirus bovino (Fulton y col., 2009) y, recientemente, se ha publicado que el virus influenza D estaría también involucrado en la patogenia de ERB (Salem y col., 2019).

Los virus considerados agentes respiratorios primarios o virus neumotrópicos son el BRSV, BPIV-3 y BoHV1 (Panciera y Confer, 2010), los cuales producen necrosis y/o apoptosis de las células epiteliales del tracto respiratorio (Ellis, 2009) y promueven la adhesión bacteriana (Panciera y Confer, 2010; Leite y col., 2002). La inmunidad innata y adaptativa se ven afectadas negativamente por la acción viral, con alteración de la función fagocítica de los macrófagos alveolares, supresión de la proliferación y producción de apoptosis de linfocitos y estimulación de secreción de citoquinas proinflamatorias (Leite y col., 2002, Panciera y Confer, 2010; Ellis, 2009). En el caso particular de BVDV, si bien no es un agente primario de lesión pulmonar, es considerado importante

dentro de la patogenia de la ERB (Panciera y Confer, 2010) dado que la infección viral aguda produce inmunodepresión por varios mecanismos (Ridpath, 2010).

### **1.2.2 Agentes bacterianos involucrados en la ERB**

Los virus predisponen a las infecciones bacterianas y por micoplasmas. Entre los agentes bacterianos más frecuentemente asociados a ERB se incluyen *Mannhemia hemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Mannhemia varigena*, *Biberstenia trehalosi* y *Trueperella pyogenes* (Caswell y col., 2012). Particularmente, *M. haemolytica* posee un rol importante en la ERB, debido a su alta capacidad para expresar factores de virulencia, entre ellos, adhesinas, polisacáridos capsulares, fimbrias y una leucotoxina específica para rumiantes que es esencial en la patogénesis de la enfermedad (Panciera y Confer 2010).

### **1.2.3 Diagnóstico de la ERB**

La interpretación tanto de los signos clínicos como de las lesiones anatomopatológicas de la ERB representa un gran desafío, porque es frecuente que signos y lesiones se solapen, lo cual dificulta su asociación con uno o más agentes infecciosos. En el mismo sentido, los signos y las lesiones en la ERB son similares a otras entidades de causa no infecciosa tales como intoxicación con neumotóxicos (3 metil-indol, 4-ipomeanol) y cuadros de hipersensibilidad, entre otras (Radostits y col., 2007; Doster, 2010; Panciera y Confer 2010). Dadas estas superposiciones en las manifestaciones clínico-patológicas de las enfermedades respiratorias inducidas por diferentes agentes es indispensable el uso de métodos complementarios de laboratorio para arribar al diagnóstico etiológico (Caswell y col., 2012).

En el caso particular de los agentes virales que participan en el desarrollo de la ERB, varios de ellos pueden producir lesiones similares (Gagea y col., 2006; Caswell y col., 2012; Caswell y Williams, 2016). Por lo tanto, para la identificación específica de cada uno se requieren distintas técnicas de diagnóstico, tales como serología, aislamiento viral, técnicas moleculares, inmunohistoquímica, entre otras (Gagea y col., 2006; Caswell y col., 2012).

### **1.3. Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV)**

#### **1.3.1 Agente etiológico**

El BRSV es un virus ARN monocatenario sentido negativo no segmentado, del género *Pneumovirus* y de la familia *Pneumoviridae* (Ferella y col., 2020); identificado por primera vez en Europa en 1970 (Brodersen, 2010). El BRSV es pleomórfico, de forma esférica o irregular, de nucleocápside helicoidal, envuelto y de 150-350 nm de diámetro (Maclachlan y Dubovi, 2011). Si bien pertenece a un grupo distinto del virus respiratorio sincitial humano (RSV), filogenéticamente, se encuentra íntimamente relacionado con este (Brodersen, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011). Por esta razón, es posible que para algunas técnicas diagnósticas como la inmunohistoquímica, anticuerpos diseñados para inmunomarcación de RSV sean útiles también en la detección de BRSV (Haines y col., 1989; Maclachlan y Dubovi, 2011). Desde el punto de vista de las características antigénicas, y sobre la base de la proteína G de superficie, se reconocen 4 subgrupos antigénicos A, B, AB y un subgrupo que permanece sin tipificar (Sarmiento-Silva., 2012).



### 1.3.2 Epidemiología

El BRSV causa enfermedad respiratoria en los bovinos ya sea por sí solo o junto a otros agentes (Brodersen, 2010; Sacco y col., 2014). En EE. UU. Desde 1974 se han identificado brotes de ERB causados por este virus (Sacco y col., 2014) y en la actualidad se lo considera endémico en la mayoría de los países del mundo (Valarcher y col., 2007). La morbilidad puede llegar hasta el 60-80% y la mortalidad hasta el 20%, particularmente en terneros (Valarcher y col., 2007). Un estudio serológico realizado en bovinos de EC mostró que el 60% de los animales seroconvirtieron para este virus y que el 95% fueron seropositivos (Collins y col., 1988; Brodersen, 2010). En otros estudios, han informado índices de seroconversión del 70% en el primer mes de ingresados al EC destacando además que, animales con títulos bajos al arribo, poseen mayor riesgo de padecer ERB (Radostits y col., 2007).

La transmisión ocurre a través de contacto directo o por aerosoles (Radostits y col., 2007) y, luego de infectados, el período de incubación es de 2 a 5 días (Valarcher y col., 2007). En el EC, donde se alojan animales de diferentes orígenes, el riesgo de infección es mayor que en explotaciones extensivas (Brodersen, 2010).

Una vez que el virus ingresa a una población, no ha sido del todo dilucidado el modo en que la infección se mantiene (Sarmiento-Silva., 2012). Un fenómeno que explica en parte la persistencia de la infección en las poblaciones bovinas es la posibilidad de reinfecciones recurrentes en el mismo animal ya que la inmunidad no es duradera para este agente (Maclachlan y Dubovi, 2011; Ferella

y col., 2020). Se ha postulado que algunos animales podrían resultar persistentemente infectados y frente a situaciones tales como cambio en la temperatura ambiental, pueden iniciar nueva eliminación de partículas virales (Brodersen, 2010). La generación continua de mutantes virales, herramienta clave de los virus ARN, es otra de las estrategias adaptativas de este virus. A pesar de la estabilidad genética, el genoma del BRSV es heterogéneo y su fidelidad de replicación es baja (Valarcher y col., 2007; Brodersen, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011).

### **1.3.3 Signos clínicos**

La infección por el BRSV puede ser subclínica o clínica, variando esta última de leve a fatal (Radostits y col., 2007). Los signos clínicos son similares a los ya presentados en el apartado de ERB y la muerte en animales infectados con BRSV puede ocurrir sin el desarrollo de neumonía bacteriana secundaria (Radostits y col., 2007).

### **1.3.4 Lesiones anatomopatológicas**

Macroscópicamente, las lesiones de terneros con neumonía por BRSV, sin infección bacteriana sobreagregada, se localizan principalmente en las regiones pulmonares craneoventrales. Se observan áreas de color rojo oscuro, deprimidas y de consistencia firme. En contraste, las áreas caudodorsales presentan un color rosa pálido, enfisema y falta de colapso (Sacco y col., 2014; Caswell y Williams, 2016).

Microscópicamente el BRSV produce neumonía broncointersticial, caracterizada por bronquiolitis necrotizante, formación de sincitios epiteliales

bronquiolares y alveolitis exudativa o proliferativa (Sacco y col., 2014; Caswell y Williams, 2016). En lesiones agudas (1-8 días post infección) se observa aplanamiento del epitelio bronquiolar, la luz bronquiolar contiene células epiteliales necróticas y moderado número de neutrófilos, e infiltrado de linfocitos alrededor de los bronquiolos. El epitelio bronquiolar adquiere apariencia irregular y se hacen presentes sincitios epiteliales. Los alvéolos contienen moderado número de neutrófilos y macrófagos en la luz y los septos alveolares se encuentran ligeramente distendidos por la infiltración de células mononucleares (Caswell y Williams, 2016). En ocasiones, se suma la presencia de membranas hialinas alveolares que deberían ser diferenciadas de las producidas en la neumonía intersticial atípica (Brodersen, 2010). Los sincitios son prominentes en esta etapa y son similares a células multinucleadas, estrechamente asociados al epitelio bronquiolar, desprendidos dentro de la luz bronquiolar y menos comúnmente en el alvéolo (Caswell y Williams, 2016; Brodersen, 2010). Con poca frecuencia, se identifican cuerpos de inclusión (CI) eosinofílicos intracitoplasmáticos en sincitios epiteliales, células mononucleares y epitelio bronquial y bronquiolar (Sacco y col., 2014). Las lesiones subagudas se observan a los 8 días post infección y representan la reparación temprana de las lesiones antes mencionadas. El epitelio bronquiolar sufre hiperplasia, desaparecen las células sincitiales y proliferan los neumocitos tipo II. Al día 10 post infección, linfocitos y células plasmáticas rodean los bronquiolos y vasos sanguíneos. Hay distensión del septo alveolar y puede identificarse bronquiolitis obliterante. En terneros que desarrollan hipertensión pulmonar secundaria a bronquiolitis

obliterante, también puede llegar a observarse una prominente hipertrofia de la capa media de las arteriolas (Sacco y col., 2014; Caswell y Williams, 2016).

La ocurrencia de bronquiolitis necrotizante con presencia de sincitios epiteliales es altamente sugestiva de infección por BRSV (Brodersen, 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la infección por el BPIV-3 también puede inducir la formación de sincitios con CI intracitoplasmáticos. Por otro lado, macrófagos multinucleados alveolares, similares a las células sincitiales, son un hallazgo frecuente en neumonías fibrinosas de origen bacteriano y probablemente representen un intento de remover el exudado alveolar fibrinoso. Su presencia puede representar un dilema diagnóstico ya que muchos terneros con BRSV desarrollan neumonía bacteriana secundaria. Por lo tanto, si las células multinucleadas están presentes en el alvéolo, pero ausentes en los bronquios, no serían indicativas de infección por BRSV a menos que las pruebas de laboratorio complementarias soporten este diagnóstico (Caswell y Williams, 2016).

### **1.3.5 Diagnóstico**

Numerosas técnicas diagnósticas han sido utilizadas para identificar BRSV en muestras clínicas y de necropsia recolectadas de animales con ERB (Brodersen, 2010). El aislamiento viral es una de ellas; sin embargo, lleva muchas veces a intentos infructuosos ya que es un virus muy lábil (Brodersen, 2010). Por esta razón, se han desarrollado otras técnicas para su identificación (Caswell y col., 2012; Sarmiento-Silva., 2012).

Las técnicas de diagnóstico más utilizadas son la detección de anticuerpos séricos contra el virus, como la seroneutralización, ELISA e inmunofluorescencia

(Samal y col., 1993; Radostits y col., 2007). La inmunofluorescencia e inmuohistoquímica son pruebas rápidas, confiables y sensibles para la detección de antígeno viral en muestras clínicas o de necropsia (Sacco y col., 2014). Por otro lado, métodos basados en la detección del ácido nucleico son comúnmente usados para identificar genes del virus a partir de diferentes tipos de muestras. Estos métodos incluyen la convencional RT-PCR (Brodersen, 2010) y la prueba de real-time RT-PCR, esta última más rápida y menos laboriosa para la detección del virus en muestras de campo o muestras de cultivos celulares (Brodersen, 2010).

### **1.3.6 BRSV en Argentina**

En Argentina, el primer aislamiento de BRSV fue en terneros de tambo con signología respiratoria (Bagnis y col. 1999). Una comunicación posterior, del mismo grupo de trabajo, caracterizó el efecto citopático inducido por el virus, mediante inmunocitoquímica (Raviolo y col., 2009).

Odeón y col. en el año 2001 evaluaron la prevalencia serológica y la distribución geográfica del BRSV, quedando demostrada la alta seroprevalencia en distintas regiones del país. En bovinos menores de 12 meses, seroprevalencias del 23,6% y del 30,2% fueron encontradas en la zona sur de Corrientes y sudeste de la provincia de Buenos Aires respectivamente (Odeón y col., 2001).

Recientemente estudios serológicos resaltaron su importancia en distintos sistemas productivos. En explotaciones extensivas, se observó que BRSV fue el virus con mayor índice de seroconversión (34%) en terneros post destete (Streitenberger y col., 2018). En explotaciones intensivas de EC se observó una

seroprevalencia individual del 78,64% (Ferella y col., 2018); mientras que en producciones lecheras la circulación del virus ha sido documentada recientemente (Ferella y col., 2020).

A partir de lo expuesto, en EC de Argentina solo contamos con información de estudios serológicos, mientras que la detección a partir de muestras de animales con ERB clínica, así como de necropsia con lesiones de ERB no han sido informadas.

#### **1.4 Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV)**

El BVDV es considerado un patógeno asociado con la ERB debido a su efecto inmunodepresor y por su posibilidad de sinergismo con otros patógenos causales de ERB (Larson, 2015). En infecciones agudas impacta negativamente en el sistema inmune lo que predispone a infecciones bacterianas secundarias a la vez que incrementa la virulencia de otros microorganismos cuando existen fenómenos de coinfección o sinergia (Ridpath, 2010).

##### **1.4.1 Agente etiológico**

El término BVDV se utiliza para denominar a un grupo heterogéneo de virus que pertenecen a 2 genotipos denominados BVDV 1 y BVDV 2 (Ridpath, 2010). A su vez, dentro del genotipo BVDV 1 pueden identificarse al menos dos subgenotipos, BVDV 1a, BVDV 1b, basados en el análisis de PCR y posterior secuenciación (Fulton y col., 2005). Entre estos genotipos, se ha documentado falta de protección cruzada por anticuerpos (Pecora y col., 2014). BVDV pertenece al género *Pestivirus* y a la familia *Flaviviridae* (Maclachlan y Dubovi,

2011) y fue aislado por primera vez en el año 1954 (Baker y col., 1954). Se trata de un virus envuelto, de genoma ARN monocatenario con polaridad positiva y no segmentado (Maclachlan y Dubovi, 2011). Sobre la base de la presencia o de la ausencia de efecto citopático del virus sobre cultivos celulares, observable mediante microscopio óptico, las cepas pueden dividirse en 2 biotipos: citopático (CP) o no citopático (NCP) (OIE 3.4.7., 2018).

### **1.4.2 Epidemiología**

La enfermedad asociada al BVDV ha sido reconocida en varios países donde existe ganado bovino. La prevalencia de la infección es alta, pero su incidencia, bajo la presentación de enfermedad de las mucosas, es baja (Radostits y col., 2007).

Los animales persistentemente infectados (PI) cumplen un rol central en el mantenimiento de BVDV en los rodeos. Esta condición ocurre en aquellos animales que sobreviven a la infección intrauterina durante el primer trimestre de la gestación y la consecuencia es que quedan infectados de forma permanente. Los animales PI excretan grandes cantidades del virus con la orina, las heces, las secreciones corporales, la leche y el espermatozoides (OIE 3.4.7., 2018) y así, favorecen la transmisión horizontal del agente hacia animales susceptibles. En general, los animales PI representan un porcentaje entre el 1 y el 2% del total de una población (OIE 3.4.7., 2018), aunque otros autores documentaron porcentajes del 4% (Quintero Barbosa y col., 2019).

Por otro lado, si bien la excreción y transmisión a partir de animales infectados de forma aguda puede ocurrir, suele ser menos frecuente (OIE 3.4.7.,

2018). La transmisión vertical de BVDV también es posible (Ridpath, 2010) y resulta importante en la epidemiología y en la patogenia de la infección (OIE 3.4.7., 2018).

Un estudio en EC demostró que animales con título alto de anticuerpos anti-BVDV al momento del ingreso al EC, presentaron menor riesgo de sufrir ERB (Martin y col., 1999). Contrariamente, también se describió que el incremento del título de anticuerpos luego del arribo favorecería un aumento en las posibilidades de sufrir ERB (Ridpath, 2010). Otra fuente de animales en EC identificó un riesgo de seroconversión para BVDV 1a del 40% con variaciones en los corrales desde 0% a 100%. (Taylor y col., 1995).

### **1.4.3 Signos clínicos**

En la infección por BVDV existen varias formas clínicas (Radostits y col., 2007):

- 1) Infecciones agudas: pueden ser subclínicas, enfermedad del tracto digestivo, enfermedad respiratoria, inmunodepresión y enfermedad hemorrágica.
- 2) Infecciones fetales: abortos, natimortos, anomalías congénitas y terneros que nacen PI.
- 3) Infecciones crónicas con posible afección de múltiples órganos y sistemas.
- 4) Enfermedad de las mucosas.

La contribución del BVDV en la ERB depende de varios factores, incluyendo la virulencia de la cepa, el tipo de infección (aguda o persistente) y la presencia de patógenos secundarios. No siempre es posible determinar si los



reportes clínicos están describiendo casos de enfermedad respiratoria en animales PI o la contribución del virus a la ERB, tal como ocurre en infecciones agudas (Campbell, 2004; Ridpath, 2010). Esta dificultad está dada principalmente por el hecho que el virus puede ser aislado del pulmón tanto en infecciones primarias agudas como en animales PI (Caswell y Williams, 2016). Aunque la infección aguda puede ocurrir en algunas situaciones, resultando directamente en enfermedad respiratoria, la mayoría de las evidencias sugieren que el virus contribuye a la presentación de la ERB principalmente como potenciador de infecciones secundarias (Ridpath, 2010).

#### **1.4.4 Lesiones anatomopatológicas**

El efecto citopático del virus puede causar inflamación catarral aguda en la cavidad nasal y tráquea y neumonía intersticial focal (Cusack y col., 2003). Sin embargo, este virus no ha sido considerado productor de neumonía intersticial por la mayoría de los autores al discutir casos de campo (Sorden y col., 2000 y Doster, 2010). Las lesiones pueden variar según el microorganismo secundario coinfectante involucrado (Cusack y col., 2003). En presencia de complicaciones bacterianas pueden encontrarse lesiones pulmonares de distribución craneoventral, rojas y firmes (Caswell y col., 2012). El virus puede también generar lesiones en otros órganos como necrosis de las placas de Peyer y erosiones y/o úlceras en la mucosa esofágica y oral. Sin embargo, también puede suceder que animales infectados con el virus no presenten lesiones macroscópicas (Caswell y col., 2012).

### **1.4.5 Diagnóstico**

El diagnóstico presuntivo se realiza sobre la base de la historia clínica, los signos y los hallazgos anatomopatológicos. No obstante, se necesitan técnicas de laboratorio para confirmar el diagnóstico. En este sentido se cuenta con las siguientes herramientas según diferentes autores (Maclachlan y Dubovi, 2011; OIE 3.4.7., 2018):

- Pruebas serológicas que detectan el incremento de título de anticuerpos séricos en muestras pareadas, indicativo de infección activa.
- Aislamiento viral en cultivos celulares.
- Pruebas de inmunofluorescencia y/o inmunohistoquímica para detección de antígenos virales en tejidos, útiles para identificar los animales PI, a partir de muestras de piel.
- Varias técnicas moleculares (RT-PCR) que han sido desarrolladas para la detección del virus en cultivos celulares y en tejidos infectados, incluyendo sangre (Caswell y col., 2012).
- Microscopía electrónica; sin embargo, la variación en el tamaño de las partículas virales hace imposible su uso para el diagnóstico definitivo en muestras de casos de campo (Ridpath, 2010).

### **1.4.6 BVDV en Argentina**

Varios son los estudios que demuestran la presencia del BVDV en nuestro país. Trabajos realizados en la provincia de Buenos Aires y Corrientes han informado sobre su alta seroprevalencia y amplia distribución en animales adultos

(Odeón y col, 2001). En el mismo estudio, un gran porcentaje de animales menores de 12 meses presentó anticuerpos para el virus, siendo de 25,6% y 41,9% para las provincias de Corrientes y Buenos Aires, respectivamente (Odeón y col, 2001). Posteriormente, un estudio en realizado en el año 2003 informó una prevalencia del 70% en bovinos no vacunados (Pacheco y col., 2003).

En relación a las cepas circulantes en nuestro medio, Pecora y col., 2014 demostraron circulación de BVDV 1a, BVDV 1b y BVDV 2 y destacaron la importancia de estos hallazgos en el desarrollo de vacunas, ya que los distintos subgenotipos no inducen a la formación de anticuerpos de reacción cruzada protectores.

Recientemente, este mismo grupo de trabajo, identificó un pestivirus (HoBi-like virus) en muestras de suero fetal lo cual es evidencia de su circulación en nuestro medio. Este trabajo resalta, además, que el mencionado pestivirus no fue identificado con las herramientas de diagnóstico molecular utilizadas de rutina para BVDV (Pecora y col., 2019). En base a lo expuesto, continúa siendo escasa la información con que contamos de las diferentes cepas del virus en bovinos de EC en Argentina.

## **1.5 Virus Parainfluenza-3 bovino (BPIV-3)**

### **1.5.1 Agente etiológico**

El BPIV-3 pertenece al género *Respirovirus* de la subfamilia *Paramixovirinae*, familia *Paramixoviridae*, orden *Mononegavirales*. Este género viral incluye a otros virus antigénicamente y genéticamente relacionados como

son el virus Sendai del ratón y los virus parainfluenza humano 1 y 3 (Maclachlan y Dubovi, 2011). Es de forma esférica a pleomórfico, de 150-200 nm, envuelto, de simetría helicoidal. Su genoma es ARN monocatenario, sentido negativo, no segmentado (Ellis, 2010). Tomando como base el análisis genético y filogenético han sido descritos 3 genotipos: A (BPIV-3a), B (BPIV-3b) y C (BPIV-3c) (Newcomer y col., 2017). Este virus fue aislado por primera vez en EE. UU. a partir de la descarga nasal de un bovino con “fiebre del transporte” en el año 1959 (Reisinger y col., 1959).

### **1.5.2 Epidemiología**

Desde su descubrimiento, se conoce que el BPIV-3 es endémico y ubicuo en las poblaciones bovinas, presentando una distribución mundial (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011). El hecho que muchos países no realicen un seguimiento epidemiológico hace difícil contar con datos de prevalencia del virus conforme han ido variando algunas formas de crianza y engorde en el ganado (Ellis, 2010).

La seroprevalencia es muy variable e históricamente el título de anticuerpos aumenta con la edad de los animales (Ellis, 2010). En México se describen variaciones del 19 al 96% (Solís-Calderón y col., 2007). En EC canadienses entre el 80,5% y el 100% de los animales fueron seropositivos al virus (Durham y Hassard, 1990). En otro estudio realizado en Finlandia, rodeos de cría y tambo con problemas clínicos de ERB, también presentaron alta prevalencia (80%) (Härtel y col., 2004).

La seroconversión en EC ha sido descrita entre el 60% y 69,5% durante el primer mes de estadía (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989; Martin y col., 1990; Fulton y col., 2000).

La infección y la enfermedad por BPIV-3 son más frecuentes en otoño e invierno, momento del año en el que suelen ocurrir también otras infecciones virales respiratorias (Ellis, 2010). BPIV-3 puede infectar varias especies de ungulados, incluyendo bovinos, cabras, ovinos, búfalos y rumiantes salvajes, así como humanos y primates no humanos (Maclachlan y Dubovi, 2011; Maidana y col., 2012).

La vía de transmisión es principalmente a través de aerosoles y fomites contaminados con descarga nasal, debido a que el virus es exclusivamente respiratorio y raramente se convierte en sistémico (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011).

### **1.5.3 Signos clínicos**

Es difícil describir los signos clínicos atribuidos la infección por el BPIV-3 como único agente, ya que en general en los cuadros de ERB son varios los patógenos involucrados.

La enfermedad en los terneros es comúnmente subclínica; la enfermedad clínica ocurre cuando otros agentes están presentes o las condiciones ambientales precipitan su presentación, pudiendo en este último caso causar enfermedad respiratoria severa (Radostits y col., 2007; Maclachlan y Dubovi, 2011; Maidana y col., 2013). En la forma leve de enfermedad clínica, los signos son escasos y leves tales como tos y polipnea con recuperación en pocos días (Radostits y col.,

2007; Ellis, 2010). En algunos casos puede haber fiebre, lagrimeo, descarga nasal serosa a mucopurulenta, depresión, disnea y tos (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011).

#### **1.5.4 Lesiones anatomopatológicas**

Las mismas consideraciones hechas para los hallazgos clínicos deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar las lesiones producidas por este virus, debido a que usualmente están complicadas por la participación de otros agentes, por ejemplo, *Mannhemia haemolytica* (Ellis, 2010).

Macroscópicamente las lesiones en casos naturales de neumonía primaria por BPIV-3 son usualmente leves y consisten en áreas de textura firme o gomosa, ligeramente abultadas o deprimidas, de color rojo-grisáceo, con un patrón lobulillar, y un compromiso craneoventral o generalizado del pulmón. En aquellos terneros que mueren por distrés respiratorio, pueden reconocerse, además, zonas de enfisema en los lóbulos caudales (Caswell y Williams, 2016).

En reproducciones experimentales, luego del desafío viral, las lesiones varían desde rinitis y traqueítis a neumonía severa. Las lesiones neumónicas (neumonía broncointersticial) consisten en atelectasia y consolidación en los lóbulos pulmonares craneoventrales (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011). Estos aparecen inicialmente sobreelevados y luego se transforman en áreas firmes, deprimidas, rojo-púrpura, observándose al corte exudado mucopurulento en las vías aéreas. Las lesiones descritas suelen ir acompañadas de linfadenomegalia (Ellis, 2010).

Microscópicamente, en casos de infección natural por BPIV-3 y sin complicación de neumonía bacteriana, se observan bronquitis y bronquiolitis necrotizante (Ellis, 2010; Caswell y Williams, 2016). Las células epiteliales que tapizan los pequeños bronquios se presentan redondeadas, ocasionalmente vacuolizadas y desprendidas dentro de la luz. La capa epitelial puede encontrarse discontinua, atenuada o hiperplásica. En los estadios agudos, muchos bronquios, bronquiolos, células epiteliales alveolares y macrófagos alveolares contienen CI intracitoplasmáticos eosinofílicos (Ellis, 2010). Los sincitios pueden estar presentes en el alvéolo, pero en menor número que en la infección por BRSV (Caswell y Williams, 2016). Las vías aéreas contienen bajo número de neutrófilos y hay infiltración linfocitaria en la pared bronquiolar (Caswell y Williams, 2016). Los alvéolos presentan atelectasia y áreas de edema, además de macrófagos y neutrófilos en la luz. Experimentalmente se ha observado hiperplasia de neumocitos tipo II y expansión del septo alveolar, cambios poco comunes en casos naturales (Caswell y Williams, 2016). Fibroblastos y macrófagos comienzan a organizar el exudado bronquiolar a los 7-12 días luego de la infección experimental, pudiendo desarrollar posteriormente bronquitis obliterante (Radostits y col., 2007; Caswell y Williams, 2016).

### **1.5.5 Diagnóstico**

El método de referencia, como en otras entidades virales a la hora del diagnóstico, es el aislamiento viral (Caswell y Williams, 2007; Ellis, 2010). A partir de secreciones nasales, el virus crece fácilmente en células MDBK o en células de turbinados nasales bovinos, observándose efecto citopático (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011). Este efecto luego se confirma mediante pruebas de

inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (Maclachlan y Dubovi, 2011). Al pertenecer al mismo género que el BRSV, el BPIV-3 es también muy lábil tanto en el transporte como durante el almacenamiento. Estas características hacen a la presencia de falsos negativos en muchas ocasiones en las que se intenta el aislamiento (Ellis, 2010). Para el diagnóstico rápido puede realizarse IF a partir de hisopados nasales (Maidana y col., 2012).

En cuanto a los test serológicos, históricamente el más utilizado ha sido la inhibición de la hemaglutinación o seroneutralización (Maidana y col., 2012; Parreño, 2018). En la actualidad también se cuenta con técnicas de ELISA (Maidana y col., 2013). A pesar de las limitaciones que presenta la serología, en muchas ocasiones la seroconversión es el único camino para descubrir la presencia del virus en brotes de ERB clínica (Caswell y col., 2012).

Por su parte las técnicas histológicas, al igual que para el BRSV, son de gran ayuda. La presencia de bronquiolitis con CI intracitoplasmáticos eosinofílicos y a menudo sincitios epiteliales son sugestivos de ambos virus. Luego, pueden diferenciarse por inmunohistoquímica (Caswell y col., 2012; Fulton y Confer, 2012).

Actualmente varias técnicas moleculares se encuentran disponibles para la detección viral a partir de muestras ante o *post mortem* como es el caso de la RT-PCR (Maidana y col., 2012; Murray y col., 2017).

La microscopía electrónica si bien puede utilizarse, no resulta útil dado que la morfología de este virus no puede ser distinguida de otros *Paramixovirus* (Maidana y col., 2012).



### **1.5.6 BPIV-3 en Argentina**

En nuestro país estudios serológicos realizados en 1980 y 1984 mostraron una seroprevalencia del 77% en bovinos (Maidana y col., 2012). Por otra parte, si bien el BPIV-3 ha sido identificado por serología en camélidos sudamericanos y ha sido aislado en bovinos, ovinos y búfalos de agua, es escasa la información con que contamos acerca de la circulación viral en poblaciones bovinas de Argentina (Maidana y col., 2012). Al presente, los genotipos circulantes en bovinos, en nuestro país a la fecha, son los genotipos A y C (Maidana y col., 2013). Esta información es realmente importante, ya que recientemente se ha postulado que los antígenos de las vacunas contienen sólo al genotipo A y la protección cruzada a través de anticuerpos entre genotipos de BPIV-3 no se conoce (Newcomer y col., 2017).

Relevamientos serológicos realizados en la década del 2000 en rodeos bovinos no vacunados de Jujuy y Neuquén indicaron que el 100% de los bovinos adultos resultaron seropositivos para el virus (Maidana y col., 2013).

## **1.6 Alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1)**

### **1.6.1 Agente etiológico**

El alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1) es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfa-herpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Su gran genoma es lineal, ADN doble cadena, envuelto y posee nucleocápside de simetría icosaédrica (Pidone y col., 1999; Muylkens y col., 2007). El tamaño del tegumento y la envoltura pleomórfica hacen que los herpesvirus posean un

diámetro variable, de entre 120 y 250 nm (Maclachlan y Dubovi, 2011). Sobre la base del análisis genómico y antigénico existen 3 subtipos del BoHV1: BoHV1.1 (1), BoHV1.2a (2a) y BoHV1.2b (2b) (Jones y Chowdhury, 2010). El subtipo 1 es el agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y es frecuentemente encontrado en el tracto respiratorio, así como también en fetos abortados. El subtipo 2a se asocia con un amplio rango de manifestaciones en el tracto respiratorio y genital, tales como IBR, vulvovaginitis pustular (IPV), balanopostitis (IPB) y abortos. El subtipo 2b se ha asociado con enfermedad respiratoria, IPV/IPB, pero no con aborto, considerándose a esta cepa menos patógena que el subtipo 1 (Jones y Chowdhury, 2010).

### **1.6.2 Epidemiología**

El BoHV1 presenta una distribución mundial y los estudios de seroprevalencia indican que prácticamente todos los animales mayores a 3 años han estado en contacto con el virus (Pidone y col., 1999; Maclachlan y Dubovi, 2011). En este sentido, se han descrito en África seroprevalencias del 14 al 60% y en América Central y América del Sur seroprevalencias que van desde 36% hasta 48% (Jones y Chowdhury, 2010). Algunos países como Finlandia, Dinamarca, Suecia y Austria han logrado la erradicación del BoHV1 (Jones y Chowdhury, 2010; OIE 3.4.11., 2018).

BoHV1 afecta naturalmente a bovinos (OIE 3.4.11., 2018) de todas las edades; sin embargo, la enfermedad clínica es más frecuente en animales mayores a 6 meses de vida (Radostits y col., 2007). La distribución geográfica es particular para cada una de las cepas (Jones y Chowdhury, 2010). Las cepas del subtipo 1

son prevalentes en Europa, América del Norte y América del Sur; las del subtipo 2a están presentes en Europa y las del subtipo 2b han sido frecuentemente aisladas en Australia y Europa. En función del sistema productivo, en bovinos de EC, la forma respiratoria del BoHV1 es la más común, con participación del subtipo 1 (Jones y Chowdhury, 2010; Caswell y col., 2012).

Martin y col., (1989) han descripto que aproximadamente un 10% de los terneros que ingresan al EC son seropositivos para BoHV1 y que entre el 2 y el 3% seroconvierten los primeros 30 días. Esto demuestra que, si bien los terneros pueden estar expuestos al virus antes de su llegada al EC, la exposición puede continuar una vez ingresados, en las etapas tempranas de alimentación. Por otro lado, la presencia de alto título en suero, al arribo de los animales, ha sido asociada con menor morbilidad de ERB (Chamorro y col., 2014).

La mortalidad por la infección por BoHV1 es baja, alrededor del 10%, mientras que la morbilidad puede alcanzar casi el 100% de los animales (Nandi y col., 2009). En la mayoría de los casos la infección viral cursa de forma subclínica, siendo las infecciones bacterianas secundarias las responsables del desarrollo de enfermedad respiratoria más severa. BoHV1 desempeña un rol importante en la ERB, por un lado estimula el sistema inmune innato a secretar citoquinas proinflamatorias y, por otro lado, es capaz de generar necrosis y apoptosis en las células infectadas y alterar negativamente la función fagocítica de los macrófagos alveolares lo que mediaría efectos inmunodepresores (Ellis, 2009; Jones y Chowdhury, 2010).

Una de las características que posee este virus, responsable de su mantenimiento en los rodeos bovinos, es la capacidad de establecer infecciones latentes (Maclachlan y Dubovi, 2011; Caswell y Williams, 2016). Una vez que el virus ingresa al organismo y se multiplica en el sitio de infección, se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro, donde permanece en estado latente (Pidone y col., 1999). Otros lugares que pueden actuar como sitios de acantonamiento viral son el tejido epitelial, leucocitos, tonsilas, linfonódulos y bazo (Pidone y col., 1999; Jones y Chowdhury, 2010). Varios son los estímulos (estresores) que pueden llevar a la reexcreción viral como ser, la preñez, la administración de corticoides, la vacunación, el transporte, el frío, el hacinamiento y las infecciones intercurrentes, entre otros (Radostits y col., 2007; Maclachlan y Dubovi, 2011).

La transmisión se da a través de aerosoles, por contacto directo con secreciones nasales, vaginales u oculares o mediante contacto indirecto con fomites, semen, alimento o agua (Maclachlan y Dubovi, 2011).

Las fuentes de infección son los bovinos infectados clínica y subclínicamente así como aquéllos que sufren la reactivación de infecciones latentes (Caswell y Williams, 2007).

### **1.6.3 Signos clínicos**

La severidad de la enfermedad causada por BoHV1 resulta influenciada por varios factores tales como: la virulencia de la cepa viral, factores de resistencia del hospedador (especialmente la edad) y la potencial infección

bacteriana concurrente (OIE 3.4.11., 2018). En el caso de la IBR, la infección puede ser subclínica o clínica (Nandi y col., 2009).

La infección subclínica es muy común, debido a la circulación de cepas con escasa virulencia y, por otro lado, dada la alta transferencia de anticuerpos colostrales a la descendencia en rodeos donde la enfermedad es endémica (OIE 3.4.11., 2018). De igual modo, en aquellos establecimientos donde se practica la vacunación, la infección es muy frecuente sin que se exprese en enfermedad clínica (Caswell y Williams, 2016). El período de incubación en las formas genitales y respiratorias es de 2 a 6 días (Jones y Chowdhury, 2010) y hasta de 10 a 20 días (Nandi y col., 2009). La forma respiratoria se caracteriza por signos clínicos del aparato respiratorio superior que incluyen: fiebre alta, anorexia, depresión, tos, salivación excesiva, descarga nasal mucosa a mucopurulenta, conjuntivitis con descarga ocular (epífora), inflamación de los ollares (origen del nombre “enfermedad de la nariz roja”) y disnea, si la laringe resulta ocluida con material purulento (Pidone y col., 1999; Jones y Chowdhury, 2010). El desarrollo de queratoconjuntivitis es común en terneros con IBR (Caswell y Williams, 2016). Es de destacar que, en ausencia de neumonía bacteriana, los animales con la forma respiratoria de la enfermedad se recuperan rápidamente, a los 4 o 5 días luego del inicio de los signos (Jones y Chowdhury, 2010).

#### **1.6.4 Lesiones anatomopatológicas**

Las lesiones macroscópicas observadas en IBR están usualmente restringidas a la cavidad nasal (rinitis), laringe (laringitis) y tráquea (traqueítis) (Ellis, 2009, Caswell y Williams, 2016; OIE 3.4.11., 2018). En las lesiones

agudas pueden observarse petequias, apariencia granular de la mucosa y exudado seroso. Comúnmente, la mucosa de los órganos del tracto superior presenta hiperemia intensa, erosiones multifocales a coalescentes con placas blanco-grisáceas que se adhieren ligeramente o ulceración difusa con exudado supurativo y fibrinonecrótico que forma una membrana pseudodiftérica (Jones y Chowdhury, 2010; Caswell y col., 2012; Caswell y Williams, 2016). Cuando el exudado es retirado de la superficie de la tráquea o de la cavidad nasal, se observa la mucosa erosionada o ulcerada y de aspecto granular grisáceo (Caswell y Williams, 2016). Esta lesión debería diferenciarse de la que se identifica en casos de neumonía bacteriana, en que se acumula el material expectorado sobre la mucosa nasal o traqueal. En estos casos, al retirar suavemente el exudado queda expuesta una superficie mucosa intacta y brillante a diferencia de lo ocurrido en las lesiones de BoHV1 (Caswell y Williams, 2016). En casos graves de BoHV1, la obstrucción del lumen traqueal o laríngeo por abundante exudado puede resultar fatal (Jones y Chowdhury, 2010; Caswell y Williams, 2016). El enfisema es una secuela de la disnea en terneros con afección severa (Caswell y Williams, 2016).

Las lesiones microscópicas más tempranas incluyen vacuolización, palidez citoplasmática y picnosis nuclear o cariólisis de las células epiteliales de la mucosa de los órganos afectados (Caswell y Williams, 2016). Infrecuentemente, pueden identificarse CI intranucleares eosinofílicos en el epitelio de tráquea, turbinados nasales, glándulas de la submucosa traqueal, bronquios y bronquiolos (Pidone y col., 1999; Nandi y col., 2009). Las lesiones más tardías incluyen erosión o ulceración de la mucosa traqueal o nasal, con necrosis y exfoliación de las células epiteliales infectadas y exudación de neutrófilos y fibrina. Además,

neutrófilos y células mononucleares infiltran la lámina propia. En el ganglio trigémino y el tronco del encéfalo suele observarse un escaso infiltrado de linfocitos. Lesiones pulmonares de neumonía viral son poco comunes. Sin embargo, los terneros jóvenes pueden desarrollar neumonía broncointersticial sin lesiones significativas en el aparato respiratorio superior. En estos casos se observa erosión del epitelio bronquiolar y proliferación de neumocitos tipo II. En los alvéolos pueden estar presentes sincitios epiteliales con o sin CI intranucleares eosinofílicos (Caswell y Williams, 2016).

### **1.6.5 Diagnóstico**

Varias son las herramientas de laboratorio disponibles para el diagnóstico de infección por BoHV1. Existen pruebas serológicas que detectan el virus o componentes del mismo o que identifican anticuerpos, tales como distintos tipos de ELISA y seroneutralización viral, entre otras (Pidone y col., 1999; Maclachlan y Dubovi, 2011). Pruebas serológicas han cobrado gran importancia en la implementación de planes de erradicación (OIE 3.4.11., 2018). Por otro lado, se han desarrollado técnicas moleculares que detectan el material genético viral como son, PCR, hibridación del ácido nucleico y secuenciación (Nandi y col., 2009).

El aislamiento viral, puntualmente en la forma respiratoria, puede realizarse a partir de hisopados nasales, conjuntivales, tracto respiratorio, tonsilas y pulmones (Radostits y col., 2007; Nandi y col., 2009). El virus crece fácilmente en cultivos celulares y produce efectos citopáticos característicos (Maclachlan y Dubovi 2011; Caswell y Williams, 2016).

Las pruebas de anticuerpos fluorescentes e inmunohistoquímica son también útiles para el diagnóstico de la infección por BoHV1, y son ventajosas cuando se necesita de un diagnóstico rápido (Pidone y col., 1999; Caswell y col., 2012).

#### **1.6.6 BoHV1 en Argentina**

Las infecciones por BoHV1 son frecuentes en nuestro país, siendo BoHV1 endémico en nuestro medio (Pidone y col., 2012).

En Argentina, durante la década del 80, un estudio demostró que el BoHV1 se encuentra difundido en todo el país, con índices de prevalencia que varían entre el 36 y el 66% y no observó diferencias entre rodeos de carne y leche (Schudel, 1987). En otro estudio, en animales entre 6 y 12 meses de vida, se identificaron seroprevalencias entre el 8,8 y el 24,8% (Odeón y col., 2001). Es de destacar que, en estos estudios, la prevalencia aumentó conforme lo hacía la edad de los animales, similar a lo descrito en otros países (Schudel, 1987; Odeón y col., 2001; Posado y col., 2013). Recientemente, un estudio realizado en la Provincia de Buenos Aires en terneros post destete determinó una prevalencia del 25% con un porcentaje de seroconversión del 13% (Streitenberger y col., 2017).



## CAPÍTULO 2

### **Enfermedad respiratoria bovina: estudio virológico longitudinal en establecimientos de engorde a corral de Argentina**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

En EE.UU. la enfermedad respiratoria bovina (ERB) presenta una incidencia del 16,2%, en engorde a corral (EC), a pesar del desarrollo de vacunas, uso de antibióticos y sistemas de manejo diseñados para mitigar sus efectos (Avra y col., 2017). Se estima que el impacto de esta enfermedad en la industria cárnica es de aproximadamente 750 millones de dólares anuales (Babcock y col., 2010). La importancia en este país se ve reflejada en estadísticas que muestran que el 95,6% de los EC presentan casos de ERB y el 59,6% de ellos realizan tratamiento metafiláctico con antibióticos para prevenirla (Eberhart, 2016).

En Argentina, si bien no contamos con fuentes oficiales que informen las pérdidas por ERB en EC, se sabe que es la enfermedad más importante en este sistema productivo, presentando una incidencia que va desde el 7,95% al 10,38% en los primeros 50 días de engorde (Fazzio y col., 2015; Galvan y col., 2019).

Los primeros 30-45 días en el EC resultan claves para el estudio de la enfermedad dado que el 70% de la morbilidad de ERB ocurre en este período (Babcock y col., 2013), motivo por el cual los diseños experimentales deberían tener muy presente esta etapa a la hora de planificar una investigación.

El EC como sistema productivo presenta varios factores que favorecen una mayor prevalencia de la enfermedad, tales como el ingreso de animales con bajo peso, viajes prolongados, mezcla de animales con distinto estatus inmunológico, edad, reorganización jerárquica, hacinamiento, cambios de alimentación, entre otros (Avra y col., 2017; Ferella y col., 2018; Galván y col., 2019). Estos factores generan estrés, que altera la microflora del aparato respiratorio superior y de la nasofaringe permitiendo el incremento o la proliferación de patógenos. En este contexto de respuesta inmune innata reducida, los agentes virales encuentran mayores oportunidades de colonizar, multiplicarse y dañar el epitelio respiratorio. En esta primera etapa de engorde, generalmente la ocurrencia de infecciones primarias, especialmente virales, coincide con el mayor momento de presentación de ERB (Ackermann y col., 2010).

La ERB resulta de una compleja interacción multifactorial entre agentes infecciosos, estresores y susceptibilidad individual (Caswell y col., 2012). Dentro de los agentes infecciosos involucrados se incluyen virus, bacterias y micoplasmas. Entre los agentes virales más frecuentemente descritos se destacan: virus respiratorio sincicial bovino (BRSV), virus parainfluenza 3 bovino (BPIV-3), alfa herpesvirus bovino 1 (BoHV1) y virus de la diarrea viral bovina (BVDV) (Caswell y col., 2012). Generalmente, son estos microorganismos quienes generan alteraciones en los mecanismos de defensa del aparato respiratorio dando lugar a infecciones por micoplasmas y/o bacterias con desarrollo de enfermedad y muerte (Timsit y col., 2016).

Para el diagnóstico de las infecciones virales se cuenta, en la actualidad, con varias técnicas, (Fulton y Confer, 2012) entre las que se destacan:

- Técnicas serológicas, que ofrecen la posibilidad de una mejor interpretación cuando se realizan en forma pareada (evaluación de seroconversión).
- Aislamiento viral (AV), técnica *gold standard*, que permite la detección de el/los virus mediante la observación de su actividad sobre un sistema biológico (cultivos celulares, animales de experimentación, etc).
- Técnicas de biología molecular (PCR, RT-PCR, RT- nested PCR) las que se han convertido en una gran herramienta en el área de la virología ya que permiten, con gran sensibilidad, detectar genes específicos, sobre todo de aquellos virus de difícil aislamiento.

En Argentina, se han identificado todos los virus asociados con ERB, ya sea a partir de estudios transversales de seroprevalencia o de aislamientos de casos clínicos. Sin embargo, no existen estudios longitudinales que hayan evaluado estos agentes y su relación con la presentación clínica de la enfermedad en establecimientos de EC.

### **1.1 Objetivos**

- a. Identificar animales clínicamente enfermos de ERB durante los primeros 60 días de encierre en establecimientos de EC.
- b. Determinar la dinámica de infección y circulación de los virus involucrados en la ERB (BRSV, BPIV-3, BoHV1 y BVDV) en terneros/terneras mediante técnicas serológicas durante los primeros 60 días de encierre en establecimientos de EC.

- c. Detectar, en el exudado nasal, los virus involucrados en la ERB mediante técnicas moleculares y de AV.
- d. Relacionar los casos de enfermedad clínica con la detección de los agentes virales involucrados en la ERB.

## **1.2 Hipótesis**

Los virus asociados con la ERB se encuentran en nuestro medio y tienen una participación destacada en el desarrollo de infecciones respiratorias durante los primeros 60 días de encierre en explotaciones de EC.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El protocolo experimental de los estudios longitudinales incluidos en este capítulo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (Protocolo interno N° 56-5-16P).

### **2.1 Animales y establecimientos**

Se realizaron tres estudios longitudinales prospectivos durante los años 2014 (LONG 2014), 2015 (LONG 2015) y 2016 (LONG 2016) en dos establecimientos comerciales de EC de la provincia de Buenos Aires, Argentina. La población de bovinos en estos establecimientos fue entre 5.000 y 10.000 cabezas totales. En todos los ensayos se utilizaron animales de la categoría ternero/ternera. En la tabla 2.1, se presenta información adicional de los 3 ensayos en relación a los

establecimientos, fechas y principales características de los animales incluidos en estudio.

**Tabla 2.1.** Información de los establecimientos, animales y fecha de realización, de los tres estudios longitudinales en bovinos de engorde a corral.

	LONG 2014	LONG 2015	LONG 2016
<b>Localización</b>	(34°47' S, 58°54' O)	(35°26' S, 57°77' O)	(35°26' S, 57°77' O)
<b>Partido</b>	Marcos Paz	Magdalena	Magdalena
<b>Fechas</b>	04-07 al 04-09	12-05 al 12-07	13-09 al 13-11
<b>Raza/s</b>	Cruza <i>Bos indicus</i> X <i>Bos taurus</i>	Aberdeen angus, Hereford y sus cruzas	Aberdeen angus, Hereford y sus cruzas
<b>Edad (meses)</b>	6 a 7	6 a 12	7 a 12
<b>Peso al ingreso (Kg)</b>	125	150	214
<b>Origen/es</b>	1 establecimiento (Esquina, Corrientes)	2 establecimientos (Dolores y Pringles, Buenos Aires)	7 establecimientos (Rauch, Buenos Aires)
<b>Mercado concentrador (remate-feria)</b>	NO	SI	SI
<b>Número de animales por corral</b>	120	149	188
<b>Número de animales seleccionados</b>	30 (23 machos y 7 hembras)	30 (hembras)	65 (31 machos y 34 hembras)
<b>Superficie del corral</b>	5500 m <sup>2</sup>	3500 m <sup>2</sup>	3500 m <sup>2</sup>
<b>Densidad</b>	45,83 m <sup>2</sup> /animal	23,48 m <sup>2</sup> /animal	18,61 m <sup>2</sup> /animal

## 2.2 Edad, sanidad, selección e identificación de los animales

Se incluyeron animales mayores de 6 meses de edad, teniendo en cuenta que los anticuerpos (Ac) maternos contra los virus en estudio decaen considerablemente a esa edad (Odeón y col., 2001; Fulton y col., 2004; Chamorro y col., 2014; Ferella y col., 2018). El plan sanitario de inicio se realizó luego de 24 h de descanso de los animales en el corral de recepción. Se suministró una única dosis de antiparasitario benzimidazol (ricobendazol-Paraxane®-Biogénesis-Bagó- LONG 2014) o endectocida (ivermectina-Bagomectina®-Biogénesis-Bagó- LONG 2015 y 2016). Se aplicó además una única dosis de vacuna polivalente clostridial (Bioclostrigen® J5-Biogénesis-Bagó) con antígenos de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Clostridium perfringens* C y D. Los animales no contaban con antecedentes de inmunización previa para los agentes virales ni bacterianos involucrados en la ERB.

Los animales incluidos en los estudios se seleccionaron aleatoriamente al momento de realizar las maniobras de sanidad. En los ensayos LONG 2014 y LONG 2015 se utilizaron 30 animales, mientras que en el LONG 2016 fueron 65. El mayor número de animales incluidos en el ensayo LONG 2016 se definió tomando en cuenta que la población (corral) se conformó a partir de 7 orígenes diferentes (Tabla 2.1). Todos los animales seleccionados, se identificaron individualmente con caravanas numeradas.

## 2.3 Alimentación

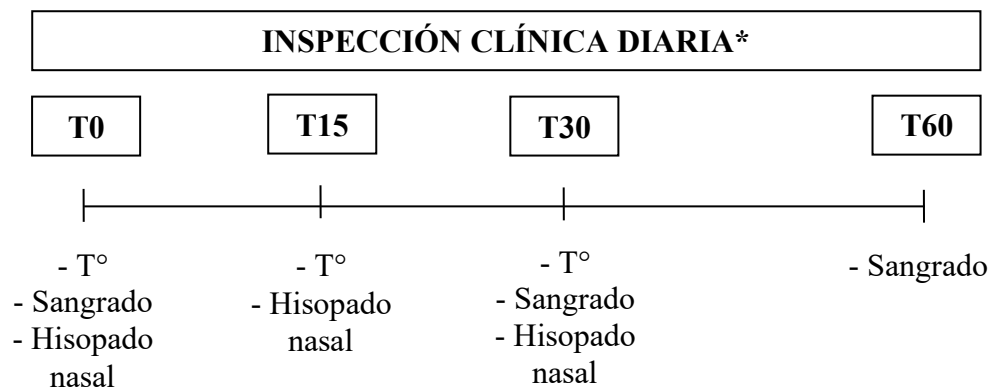
En ambos establecimientos, la alimentación se basó en silo de maíz, grano de maíz, pellet de girasol o malta y núcleo vitamínico mineral. El contenido de

proteína y fibra representó un  $15\pm 2\%$  y  $25\pm 3\%$  en los primeros 20-25 días, respectivamente. Posteriormente, se administró una dieta de transición y una dieta de finalización las cuales poseían un contenido de proteína y fibra del  $12\pm 3\%$  y  $8\pm 3\%$ , respectivamente. El agua fue provista en bebederos de manera *ad libitum*.

#### **2.4 Cronograma de muestreos**

Los ensayos longitudinales se desarrollaron durante los primeros 60 días de estadía en el EC. Durante el período, los animales permanecieron en un mismo corral sin ingreso ni egreso de otros animales. El día del arribo al establecimiento fue considerado como el tiempo 0. El cronograma de muestreos y registros realizados se presentan en la figura 2.1.





**Figura 2.1.** Cronograma de muestreo y registros realizados en los ensayos longitudinales 2014, 2015 y 2016 durante los primeros 60 días de estadía en EC. T0 día de arribo de los animales al engorde a corral. T60 día de finalización del ensayo.

T°: temperatura corporal rectal.\*Los animales con signos clínicos compatibles con ERB fueron apartados y se les realizó evaluación clínica individual, hisopado nasal y lavado broncoalveolar.

## 2.5 Evaluación clínica

Los animales fueron monitoreados diariamente en el corral y todo aquel que presentó signos clínicos compatibles con ERB se condujo a la manga para realizar el examen clínico individual. Los signos clínicos se clasificaron según su severidad de acuerdo al *score* propuesto por Hanzlicek y col., 2010 (Tabla 2.2). Animales con *score* mayor a 1, T° corporal rectal igual o mayor a 40 °C y sin signos clínicos de otra enfermedad se consideraron enfermos clínicos de ERB.

**Tabla 2.2.** *Score* de signos clínicos utilizados para categorizar la enfermedad respiratoria bovina.

<b>SCORE</b>	<b>SIGNOS CLÍNICOS</b>
<b>1 (normal)</b>	sin signos clínicos
<b>2 (levemente enfermo)</b>	moderada depresión vientre sumido
<b>3 (moderadamente enfermo)</b>	depresión severa del sensorio disnea descarga nasal u ocular
<b>4 (severamente enfermo)</b>	moribundo escasa respuesta a estímulos

Al momento de detectar un animal con enfermedad clínica, se le realizó hisopado nasal, lavado broncoalveolar (BAL) y antibioticoterapia. Para el tratamiento antibiótico se respetó el protocolo de procedimiento habitual de cada establecimiento.

En aquellos casos en que, durante el período en estudio, se produjo la muerte de animales pertenecientes al corral en evaluación se realizó la necropsia completa y se obtuvieron muestras para estudios complementarios (histopatología, bacteriología y virología).

### **2.5.1 Hisopado nasal**

Para la obtención de estas muestras, cada animal fue inmovilizado en el cepo de la manga y se introdujo profundamente un hisopo de poliestireno estéril (Deltalab, Barcelona, España) en la fosa nasal derecha realizándose rotaciones durante 1 minuto aproximadamente, para embeberlo en la secreción. Posteriormente el hisopo se colocó en un criovial de 2 ml (Deltalab, Barcelona, España) con 500 µl de medio de mantenimiento celular (M-MEM) (*Minimal essential medium*), suplementado con 2mM de glutamina, 1% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) y 0,2% de fungizona. Se cortó el extremo del hisopo que tuvo contacto con el operador, se cerró el criovial y se almacenó en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

### **2.5.2 Lavado broncoalveolar (BAL)**

Cada animal fue inmovilizado en el cepo de la manga y sedado con 0,1 mg/kg de xilacina al 2% (Xylazine 2%®-Alfasan, Netherlands). Se realizó la

limpieza de ambos ollares con gasas secas y se extendieron la cabeza y el cuello para facilitar el pasaje de la sonda. Se utilizó una sonda estéril descartable tipo Levin K-9 (Maidenlab SRL, Buenos Aires, Argentina) de 125 cm de largo y 4 mm de diámetro. La sonda se lubricó con solución fisiológica estéril en su extremo y luego se introdujo en el orificio nasal izquierdo en dirección caudal y medial hasta encontrar resistencia en la faringe caudal. Posteriormente, se avanzó con la sonda durante la fase inspiratoria del ciclo respiratorio (apertura de glotis) hasta encontrar resistencia a su pasaje, constatándose la ocurrencia de accesos de tos indicativos de una correcta colocación. Luego, se instilaron 120 ml de solución fisiológica estéril (B. Broun Medical SA, Buenos Aires, Argentina) con una jeringa tipo Tommey de 60 ml (Laboratorios Jayor, Buenos Aires, Argentina). Se realizó presión negativa con la jeringa para aspirar el fluido, maniobra que permitió recuperar una parte del líquido introducido (10 a 40 ml). La muestra recolectada fue colocada en un recipiente estéril y almacenada a -70 °C hasta su procesamiento.

## **2.6 Serología**

En los T0, T30 y T60 se obtuvieron muestras de sangre (10 ml totales) por punción de la vena yugular, que se colocaron en un tubo sin anticoagulante. Posteriormente la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos y el suero obtenido se almacenó en tubos de polipropileno tipo Eppendorf a -20 °C hasta su utilización. Se realizó la determinación de Ac específicos contra BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1.

### 2.6.1 Detección de anticuerpos para BRSV

La determinación de Ac séricos anti-BRSV se realizó mediante la técnica de SN (seroneutralización) según lo propuesto por Samal y col., 1993. Se empleó el método suero variable-virus fijo, en el cual diluciones variables de sueros problema (seriadas en base 2 desde 1/4) se enfrentaron a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50/ml). Los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos. Las diluciones de las muestras se realizaron en E-MEM, suplementado con 2% de SFB. Las muestras se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos, en las diluciones apropiadas en el medio de mantenimiento (E-MEM suplementado con 2% de SFB). Luego, en las primeras 2 réplicas de cada dilución de suero, se agregó un volumen de la dilución del virus de trabajo (cepa A51908 de BRSV) en una proporción 1:1. Como control de toxicidad de la muestra, a la tercera réplica se le agregó sólo medio de mantenimiento. Las placas con la mezcla suero-virus se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 1 h y luego, se trasvasaron 100 µl de dicha mezcla sobre una monocapa preformada de células MDBK (células Madin-Darby bovine kidney, 25.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos con fondo plano (Costar, Thermo Fisher Scientific, Mass, USA). Las placas se incubaron en las mismas condiciones descriptas anteriormente. La lectura del ensayo se realizó por observación del efecto citopático (ECP) al microscopio óptico entre los 4-5 días posteriores a la infección. En cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: un control positivo fuerte (suero hiperinmune anti-BRSV de cobayo o suero positivo de bovino infectado naturalmente), un control positivo débil (suero hiperinmune de cobayo o suero positivo de bovino) y un control negativo (suero normal de cobayo

o suero de bovino negativo). Asimismo, se incluyeron un control de células sin infectar y el control de la dilución del virus de trabajo (control 100 DICT).

El título de anticuerpos neutralizantes (AcN) se expresó como la inversa de la máxima dilución en la que no se observó ECP.

#### 2.6.1.1 Interpretación de los resultados

Las muestras se consideraron positivas cuando se observó la inhibición del ECP característico en una dilución igual o mayor a 4; títulos menores se interpretaron como negativos. Títulos iguales o menores a 32 al T0, fueron considerados bajos (Ferella y col., 2018). Por último, se estimó que los animales presentaron seroconversión cuando se observó un incremento de 4 veces o más en el título de AcN en base 2, entre dos muestreos (Fulton y col., 2000).

#### 2.6.2 Detección de anticuerpos para BVDV

Las técnicas de SN para la detección de AcN de BVDV 1a, BVDV 1b y BVDV 2 se basaron en el método de virus fijo-suero variable (Pecora y col., 2014). Para la dilución de los sueros se siguió idéntico procedimiento que en el apartado 2.6.1 Posteriormente se les agregó 100 DICT de BVDV. Se utilizaron tres cepas CP de virus de BVDV. Dos de ellas representantes del genotipo 1: cepa Singer - DQ088995 (subgenotipo 1a) y cepa 25366 (subgenotipo 1b) y la restante cepa, del genotipo 2: cepa VS253 (subgenotipo 2a). Esta mezcla se realizó en placas de cultivo sin células, y se dejó incubando por 1 h a 37 °C en estufa de CO<sub>2</sub>. La incubación de la mezcla virus-suero en la placa de cultivo celular se realizó de la misma manera a lo expuesto en 2.6.1. El título de AcN se expresó como la inversa de la máxima dilución en la que no se observó ECP. Cada ensayo

incluyó una titulación viral utilizando el método de *Reed & Muench* (Reed y Muench, 1938), para confirmar las DICT utilizadas y un control de toxicidad celular. Se utilizaron, un suero positivo para BVDV obtenido a partir de un animal experimentalmente infectado y un suero negativo para BVDV a partir de un animal no infectado, como controles positivo y negativo respectivamente.

#### 2.6.2.1 Interpretación de los resultados

Las muestras se consideraron positivas cuando se observó la inhibición del ECP característico en una dilución igual o mayor a 8; títulos menores se dieron por negativos. Títulos iguales o menores a 32 al T0 fueron considerados bajos (Bolin y Ridpath, 1995; Parreño, 2018). Por último, se estimó que los animales presentaron seroconversión cuando se observó un incremento de 4 veces o más en el título de AcN en base 2, entre dos muestreos (Fulton y col., 2000).

#### 2.6.3 Detección de anticuerpos para BPIV-3

La determinación de Ac séricos anti-BPIV-3 se realizó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) (Martin y Bohac, 1986). Los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se pretrataron con caolín al 0,8% en solución *buffer* fosfato (PBS) para adsorber inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. Para esto, una mezcla de partes iguales (50 µl) de suero y caolín al 0,8% fue incubada durante 10 min a temperatura ambiente. Esta mezcla diluida 1/2 se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min y posteriormente, 50 µl de sobrenadante se rediluyeron en 75 µl PBS en una placa de fondo plano resultando en una dilución de 1/5. De esta última dilución se continuaron haciendo diluciones seriadas en base 2 hasta llegar a 1/1280 en una placa de 96 pocillos fondo en U



(Nunc, Thermo Fisher Scientific, Mass, USA) con un volumen final de 25  $\mu$ l en cada pocillo. Luego, a cada pocillo, se le agregó 25  $\mu$ l de solución de virus de trabajo y se incubó 1 h a temperatura ambiente. El virus utilizado (cepa de campo de BPIV-3 genotipo C) fue previamente titulado para asegurar un título de 8 unidades de hemaglutinación (UHA)/25  $\mu$ l (Anexo 1). Finalmente, a todas las diluciones se le agregaron 50  $\mu$ l de suspensión de glóbulos rojos de cobayo en una dilución 1/120 (Anexo 2), dejándose a temperatura ambiente durante 1 h hasta la lectura de resultados. Las diluciones seriadas finales en base 2, posteriores a la incorporación de la solución de virus de trabajo y glóbulos rojos, fueron desde 1/20 hasta 1/5120. En cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: suero bovino positivo (título de 320 o 640) expresado como unidades de inhibición de hemaglutinación (UIHA), suero bovino positivo fuerte (título de 1260 UIHA), suero bovino negativo y tres controles de glóbulos rojos; uno de ellos con inoculación de suero únicamente, otro con inoculación de solución de virus de trabajo y el restante sin inoculación. La lectura de los resultados se realizó por observación directa de las placas, considerándose hasta la máxima dilución en la que el fenómeno de hemaglutinación resultó inhibido, reconociéndose la formación del botón rojo característico en el fondo del pocillo. El título de Ac expresado en UIHA se obtuvo de multiplicar la inversa de la dilución máxima en la que se produjo reacción de IHA por las unidades hemaglutinantes del virus utilizado (8 UHA/25  $\mu$ l).

#### 2.6.3.1 Interpretación de los resultados

Las muestras se consideraron positivas cuando el título fue igual o mayor a 160 UIHA; títulos menores se dieron por negativos. Títulos iguales o menores a

320 UIHA al T0 fueron considerados bajos (Parreño, 2018). Por último, se estimó que los animales presentaron seroconversión cuando se observó un incremento de 4 veces o más en el título de Ac en base 2 (Fulton y col., 2000) o cuando se identificó el cambio de estatus de seronegativo a seropositivo, entre dos muestreos (Hägglund y col., 2006).

#### **2.6.4 Detección de anticuerpos para BoHV1**

Los Ac anti-BoHV1 se determinaron mediante la técnica de ELISA indirecto (Romera y col., 2000; Parreño y col., 2010). Las soluciones utilizadas en esta prueba se detallan en el anexo 3.

##### **2.6.4.1 Sensibilización de las placas de ELISA**

Las placas Immulon 1B (Dynatech Laboratories) fueron sensibilizadas con 50 µl de antígeno positivo (células MDBK infectadas con la cepa de referencia Los Angeles de BoHV1 concentrada y semipurificada conteniendo 109 DICT50/ml) o 50 µl de antígeno negativo (células MDBK no infectadas) en *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6 e incubadas tapadas por 12 h a 4 °C. Luego se descartó el contenido de la placa y se lavó 3 veces con *buffer* de lavado (PBS/Tween 0,05%). Se colocaron 100 µl/pocillo de *buffer* de bloqueo (PBS Tween 20 OVA 1% -ovoalbúmina 1%-, PH 7,4) y se incubó 1 h a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. Se descartó el contenido de la placa y se lavó 2 veces con *buffer* de lavado.

##### **2.6.4.2 Selección de animales con anticuerpos para BoHV1**

Se realizó un *screening* de los sueros para detectar aquellos con Ac anti-BoHV1. Para esto se diluyeron las muestras en PBS Tween OVA de la siguiente manera: en una placa sustituta, primero se realizó una dilución 1/4 (150 µl de PBS

Tween OVA + 50 µl de suero problema) y luego se traspasaron 60 µl a la segunda columna que contenía 90 µl de PBS Tween OVA (dilución 1/10). A partir de esta dilución se traspasaron 50 µl en un pocillo con 150 µl de PBS Tween OVA para obtener la dilución de 1/40. Cincuenta µl de esta dilución fueron sembrados en la placa de reacción e incubados 1 h a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se descartó el contenido de la placa y se lavó 4 veces con *buffer* de lavado. Como conjugado se utilizó suero de cabra anti-IgG bovina marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, MA, USA) en una dilución 1:4000 en PBS Tween OVA (50 µl en cada pocillo), según lo recomendado por el fabricante. Para el revelado se agregaron 50 µl de solución de uso de ABTS (ácido cítrico 0,1M, fosfato disódico 0,2M, 0,3 mg/ml de azino dietil benzotiazol sulfonato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01%) en cada pocillo y se dejaron reaccionar durante 10 min o hasta que los controles entraran en el rango esperado de lectura y llegaran a su título correspondiente. El frenado de la reacción se realizó con el agregado de 50 µl de dodecil/laurel sulfato de sodio al 5%. Se leyó la densidad óptica (DO) a una absorbancia de 405-410 nm (para ABTS) en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems). Las densidades ópticas se analizaron en planilla de cálculo (Office Excel .xls) y se calcularon las densidades ópticas corregidas (DOc). La muestra se consideró francamente positiva cuando la DOc fue mayor al 20% de la absorbancia corregida del control positivo (*cut off*). Se incluyeron los siguientes controles: un control positivo (suero de bovino naturalmente infectado con BoHV1 con título de  $0,96 \pm 0,210$  por ELISA o un título de Ac 2,4-3 por SN), un blanco de reactivos (PBS) y un control negativo (suero de bovino negativo por SN). El porcentaje de positividad para este último estuvo siempre por debajo del *cut off* de la técnica. Para cada uno

de los controles se utilizaron 4 pocillos: dos capturas positivas (con agregado del conjugado) y dos capturas negativas (sin agregado de conjugado). Estas muestras se sembraron aleatoriamente en distintos lugares en al menos dos de las placas del ensayo y se corrieron en todos los ensayos.

Los sueros positivos se seleccionaron y posteriormente se titularon para determinar los niveles de Ac en estos animales.

#### 2.6.4.3 Titulación de anticuerpos anti BoHV1

Se realizaron 3 diluciones seriadas en base 4 en PBS Tween OVA desde 1/40 hasta 1/640. Estas diluciones se procesaron de idéntica forma a lo indicado en 2.6.4.2. La muestra se consideró francamente positiva cuando la DOc fue mayor al 40% de la absorbancia corregida del control positivo (*cut off*). El título de Ac de una muestra se estableció como la inversa de la máxima dilución cuya DOc fuese mayor al 40% del control positivo.

#### 2.6.4.4 Interpretación de los resultados

Las muestras se consideraron positivas cuando el título fue igual o mayor a 40; títulos menores fueron considerados negativos. Títulos iguales o menores a 40 al T0 fueron considerados bajos (Bolin y Ridpath., 1995; Parreño, 2018). Se estimó seroconversión cuando, entre dos muestreos, se produjo un incremento de 2 veces o más en el título de Ac en base 4 o en los casos en que se observó un cambio de estatus de seronegativo a seropositivo (OIE 3.4.11., 2018).

## **2.7 Aislamiento viral en cultivo de células a partir de hisopados nasales**

Los hisopos nasales de cada animal muestreado, en cada uno de los tiempos (T0, T15 y T30) y ensayos realizados (LONG 2014, 2015, 2016) se procesaron de manera individual (375 hisopos de 125 animales).

En primer lugar, se procedió al aislamiento de el/los virus de cada muestra en un soporte biológico (células MDBK) seguido de la observación de ECP. Posteriormente, se realizó detección viral por técnicas de biología molecular.

### **2.7.1 Pasajes en células MDBK**

Se realizaron 5 pasajes seriados en células MDBK. Para esto, se sembraron 50 µl de cada muestra por duplicado en placas de 96 pocillos conteniendo una monocapa de células con una confluencia del 80%. Para favorecer la absorción viral se incubó 1 h a 37 °C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se agregaron, a cada pocillo, 50 µl de medio de mantenimiento y se incubó durante 5 días en las condiciones descriptas en 2.6.1. La aparición de ECP se chequeó diariamente. Transcurridos los 5 días post inoculación, las placas se congelaron a -70 °C. Para los siguientes pasajes, las muestras se descongelaron y centrifugaron a 1000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se sembró sobre una monocapa de células MDBK en placas de 96 pocillos.

### **2.7.2 Selección de muestras y armado de *pools* para detección viral mediante técnicas de biología molecular**

Todos los sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con las diferentes muestras que mostraron y no mostraron ECP visible al microscopio óptico fueron analizadas por técnicas moleculares para los 4 virus estudiados. Algunas muestras

produjeron efecto tóxico sobre la monocapa celular por lo que no fue posible evaluar si algún virus produjo ECP visible.

Sobre la base teórica del concepto que con al menos un virión viable en la muestra puede crecer en cultivo de células y luego de 5 pasajes producir material suficiente para su posterior identificación (Maclachlan y Dubovi, 2011), se realizaron *pools* de 5 muestras cada uno. La confección de *pools* para posterior identificación por PCR se realizó respetando el tiempo de muestreo (T0, T15 y T30) y el año de realización (LONG 2014, 2015 y 2016).

#### 2.7.2.1 Técnicas de diagnóstico molecular (PCR, RT-PCR y RT-nPCR)

Para detección de BoHV1 se utilizó una PCR múltiple que diferencia el BoHV1 del BoHV5 (Claus y col., 2005); RT-PCR para detección de BPIV-3 (Maidana y col., 2012) y BVDV (Vilcek, 1994) y, en el caso de BRSV, se utilizó una RT- *nested* PCR (RT-nPCR) (Vilcek y col., 1994). En todos los ensayos de PCR se incluyeron un control positivo y controles negativos para cada paso de la técnica (extracción de ácidos nucleicos, síntesis del ADNc y PCR).

##### 2.7.2.1.1 Extracción de ADN y ARN

Dado que se estudiaron agentes virales con genoma ADN así como ARN, se procedió a una extracción doble ADN/ARN con un kit comercial (TIANamp Virus DNA/RNA Kit, Tiangen, China) según las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido, el producto de extracción (ácidos nucleicos) se guardó a -70 °C hasta su utilización.

#### 2.7.2.1.2 Oligonucleótidos iniciadores (*primers*)

Los productos a amplificar del genoma viral fueron: una secuencia conservada de la proteína de fusión (F) del BRSV; una región no codificante conservada del 5'-UTR del género pestivirus (BVDV); una secuencia específica del genoma viral correspondiente a la glicoproteína C del BoHV1 y 5 y un fragmento de la proteína de matriz (M) del BPIV-3.

En el anexo 4 se detallan, el nombre de los oligonucleótidos iniciadores para cada uno de los virus, su secuencia nucleotídica 5'-3' y el tamaño del producto de amplificación.

#### 2.7.2.1.3 Síntesis de ADNc (BRSV, BVDV y BPIV-3)

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído, se llevó a cabo una transcripción reversa (RT-PCR). Se utilizó la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Promega, Wis, USA). Las cantidades de *buffer* 5X de M-MLV (Promega, Wis, USA), oligonucleótidos iniciadores (Invitrogen, Mass, USA), RNAsin (Promega, Wis, USA), DTT 0,1M (ditriotreitól), dNTPs 25mM (Promega, Wis, USA), M-MLV RT 200U/ $\mu$ l, agua DEPC (Sigma, Mo, USA) y producto de extracción (ARN) para cada una de las mezclas de retrotranscripción se presentan en el anexo 5. Una vez preparada la mezcla de reacción, se llevó a cabo la transcripción reversa en un termociclador (T-18 IVEMA) según el siguiente programa: se incubó la mezcla a 42 °C durante 60 minutos y luego la enzima fue inactivada mediante una incubación de 5 minutos a 95 °C. Una vez obtenido, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Los reactivos y cantidad de producto de extracción (ARN) utilizados por reacción en las mezclas de transcripción reversa (RT) de BPIV-3, BVDV y BRSV se presentan en el anexo 5.

#### 2.7.2.1.4 PCR, RT-PCR y RT-nPCR

La amplificación del ADN y ADNc se llevó a cabo en un termociclador Simplicamp™ Thermal cycler (Applied Biosystems). Para la preparación de las mezclas de PCR se utilizaron los siguientes reactivos: GoTaq Polymerase 5U/μl (Promega, Wis, USA), *buffer* 5X de Go Taq (Promega, Wis, USA), oligonucleótidos iniciadores (Invitrogen, Mass, USA), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 25mM (Promega, Wis, USA), agua DEPC (Sigma, Mo, USA) y DMSO 8% (Sigma, Mo, USA). Las cantidades de cada uno de estos reactivos, ADN o ADNc y programas de ciclado para cada virus se detallan en los anexos 6 y 7.

#### 2.7.2.1.5 Electroforesis en gel de agarosa

A fin de observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó con *buffer* TAE 1X (0,484% m/v Tris/ 0,1142% v/v Ácido acético 99,7%, 0,05M EDTA 0,5 M, pH 8) y 1,5% p/v de agarosa y luego se agregó el intercalante GelStain 1X (AP Biotech, Buenos Aires, Argentina). La separación electroforética se llevó a cabo en *buffer* TAE 1X y aplicando un voltaje constante de 100 V, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la corrida, se verificó la amplificación mediante la visualización de las bandas de ADN en el gel en un transiluminador de luz UV. Los geles se fotografiaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se



digitalizaron utilizando el equipo GelDoc (BioRad) y el *software Quantity One 1-D Analysis Software* (versión 4.6.3) provisto por el fabricante.

## **2.8 Técnicas de diagnóstico molecular a partir de hisopados nasales de animales seroconvertidos**

Para la identificación de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en los animales que seroconvirtieron (infección viral activa) se seleccionaron los hisopos nasales de estos animales y se realizaron técnicas de diagnóstico molecular. En los casos donde la seroconversión ocurrió en el T30, se realizó un *pool* de 200 µl de los hisopos T0 (100 µl) y T15 (100 µl) para detección del genoma viral. En el caso de los seroconvertidos al T60, el *pool* se armó con los hisopos del T15 y T30. Las técnicas de diagnóstico molecular se realizaron según lo expuesto en 2.7.2.1.1 a 2.7.2.1.5.

Complementariamente, se genotipificaron 5 muestras positivas a BVDV (n=2 LONG 2014; n= 2 LONG 2015 y n=1 LONG 2016). Los segmentos amplificados de las muestras positivas mediante RT-PCR (288 pb correspondientes a un fragmento del 5'UTR) se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando un kit comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Universal DNA Purification Kit -DP214, Tiangen, China).

El ADN purificado se cuantificó por nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Para cada reacción de secuenciación se remitieron 80 ng al Servicio de Secuenciación del CICVyA-INTA-Castelar. Para la secuenciación se utilizaron los mismos *primers* con los que se amplificó el fragmento. Se analizaron los cromatogramas obtenidos y, una vez arregladas las secuencias, se armaron los

consensos de cada secuencia utilizando el *software* BioEdit 7.1.3.0 (Hall., 1999). Las secuencias de cinco muestras positivas obtenidas en este trabajo se subieron al GenBank usando el *software* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **2.9 Criterio para considerar animales persistentemente infectados (PI) por BVDV**

Se consideró animal persistentemente infectado (PI) por BVDV a aquellos animales negativos, mediante la técnica de SN (genotipos 1a, 1b o 2), en los tiempos T0, T30 y T60, pero con resultados positivos a partir de hisopados nasales (T0, T15 y T30) por RT-PCR. La técnica de RT-PCR para detección de BVDV se describió en los apartados 2.7.2.1.1 a 2.7.2.1.5.

## **2.10 Aislamiento viral y técnicas de diagnóstico molecular en animales con ERB clínica**

Los hisopados nasales y fluidos de BAL obtenidos de animales con enfermedad clínica fueron analizados individualmente. Para su procesamiento, estas muestras se descongelaron y se homogeneizaron mediante vortex. Luego se prosiguió con el protocolo para aislamiento viral en cultivo de células descrito en el apartado 2.7. Por último, se realizó detección de BRSV, BPIV-3, BoHV1 y BVDV por medio de técnicas moleculares a partir de hisopo nasal, fluido de BAL, sobrenadante de cultivo (5° pasaje) del hisopado nasal y sobrenadante de cultivo (5° pasaje) del fluido de BAL. Las técnicas de PCR, RT-PCR y RT-nPCR utilizadas, fueron descriptas en los apartados 2.7.2.1.1 a 2.7.2.1.5.

## 2.11 Análisis estadístico

Para explicar la variabilidad en la titulación de Ac a lo largo del período de estudio se ajustó un modelo de regresión lineal con medidas repetidas en el tiempo (ProcGLIMMIX, SAS 9.4.). Los títulos de Ac fueron transformados al Log10 para su análisis dado que no respetaron el supuesto de normalidad. Las variables explicativas fueron tiempo (T0, T30 y T60), sexo, peso al arribo y las interacciones de primer orden de interés. La selección de los modelos finales se realizó mediante un método eliminación de variables hacia atrás, siendo la significación estadística  $p < 0,05$  para los efectos principales y  $p < 0,1$  para las interacciones biológicas. Para tener en cuenta la correlación entre mediciones de un mismo individuo se especificó una estructura de correlación autorregresiva de primer orden. Los resultados se expresaron como medias de los mínimos cuadrados.

Para determinar las probabilidades de seroconversión en los diferentes momentos del ensayo se construyeron diferentes estratos temporales (T0-T30, T30-T60 y T0-T60) y se dicotomizó la ocurrencia de la seroconversión (SI/NO) para cada uno de estos períodos. Cada animal seroconvertido participó solo de uno de los períodos definidos (autoexcluyente). Se utilizó un modelo de regresión logística multivariado con los estratos temporales y la cohorte (LONG), como únicos predictores fijos. El sexo de los individuos fue incluido como predictor, pero no se lo retuvo en el modelo final por no ser estadísticamente significativo. La comparación entre los períodos se realizó mediante las diferencias de medias de los mínimos cuadrados (ProcGLIMMIX, SAS 9.4.). Se estableció un valor de

$p < 0,05$  como estadísticamente significativo, mientras que valores entre 0,051 y 0,1 indicaron tendencia.

La asociación entre el título de Ac al arribo (título alto/bajo) y la seroconversión se analizó mediante la técnica de Chi<sup>2</sup>. Se estableció un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo, mientras que valores entre 0,051 y 0,1 indicaron tendencia.

Las figuras de la sección resultados fueron realizadas con el programa Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1.1 Morbilidad y mortalidad**

La morbilidad de ERB fue del 0% en el LONG 2014 y del 6,6% y 6,1% en los LONG 2015 y 2016 respectivamente.

En el ensayo LONG 2015, se identificaron dos animales (animal A091 y 122), a los días 15 y 23 de estadía en el EC, con *score* 3 de ERB clínica. En el LONG 2016 se observaron cuatro animales con ERB clínica los días 1 (animal 49), 9 (animal 14), 10 (animal 41) y 12 (animal 5) de estadía en el EC. Los tres primeros (49, 14 y 10) con *score* 2 y el animal 5 con *score* 3. Todos los animales con ERB clínica mostraron respuesta favorable al tratamiento antibiótico.

En todos los ensayos realizados murió un solo animal (animal 14, LONG 2016 - figuras 2.2 y 2.3). Si bien, luego de la terapéutica antibiótica (día 9)

presentaba una mejoría de la afección respiratoria, la gravedad de su estado clínico hizo que el día 30 se decidiera la eutanasia.

Este animal presentó decúbito permanente, marcada depresión, desmedro, deshidratación y laminitis severa crónica en el miembro posterior derecho con desprendimiento parcial de la pezuña.

### **3.1.2 Hallazgos de necropsia y estudios complementarios**

#### **3.1.2.1 Lesiones macroscópicas**

En el único animal muerto (animal 14, LONG 2016), en pulmón se identificaron dos focos de adherencia pleural, secuelas de lesión pulmonar, en la parte caudal del lóbulo craneal izquierdo y en la zona craneomedial del lóbulo caudal izquierdo (figura 2.3). Se observó miositis y fascitis multifocal supurativa severa crónica caracterizada por abscesos de diámetro variable entre 7 y 20 cm de diámetro en muslos izquierdo y derecho. Los linfonódulos poplíteos evidenciaron aumento de tamaño. La pezuña del miembro posterior derecho presentó desprendimiento parcial con abundante cantidad de exudado purulento maloliente en el rodete coronario. Otros hallazgos fueron: marcada pérdida de biomasa, atrofia serosa de la grasa pericárdica, perirrenal y retroocular, ascitis (300 ml) e hidropericardio (30 ml).



**Figura 2.2.** Animal 14 muerto durante el ensayo longitudinal 2016 (LONG 2016).

**Figura 2.3.** Focos de adherencia pleural en la parte caudal del lóbulo craneal izquierdo y entre los lóbulos pulmonares.

### 3.1.2.2 Análisis complementarios

#### Histopatología, bacteriología y virología

En pulmón se observó pleuritis multifocal crónica, además de una respuesta intersticial leve en septo alveolar compuesta por infiltrado celular de linfocitos y macrófagos. En músculo esquelético, miositis y fascitis fibrinopurulenta localmente extensiva severa crónica con abscesos, trombosis y gran cantidad de bacilos intralesionales.

La marcha bacteriológica a partir de muestras de pulmón resultó negativa.

Los estudios moleculares para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3, BoHV1 y BoHV5 a partir de muestras de pulmón resultaron negativos.

## 3.2 Serología

### 3.2.1 Serología BRSV

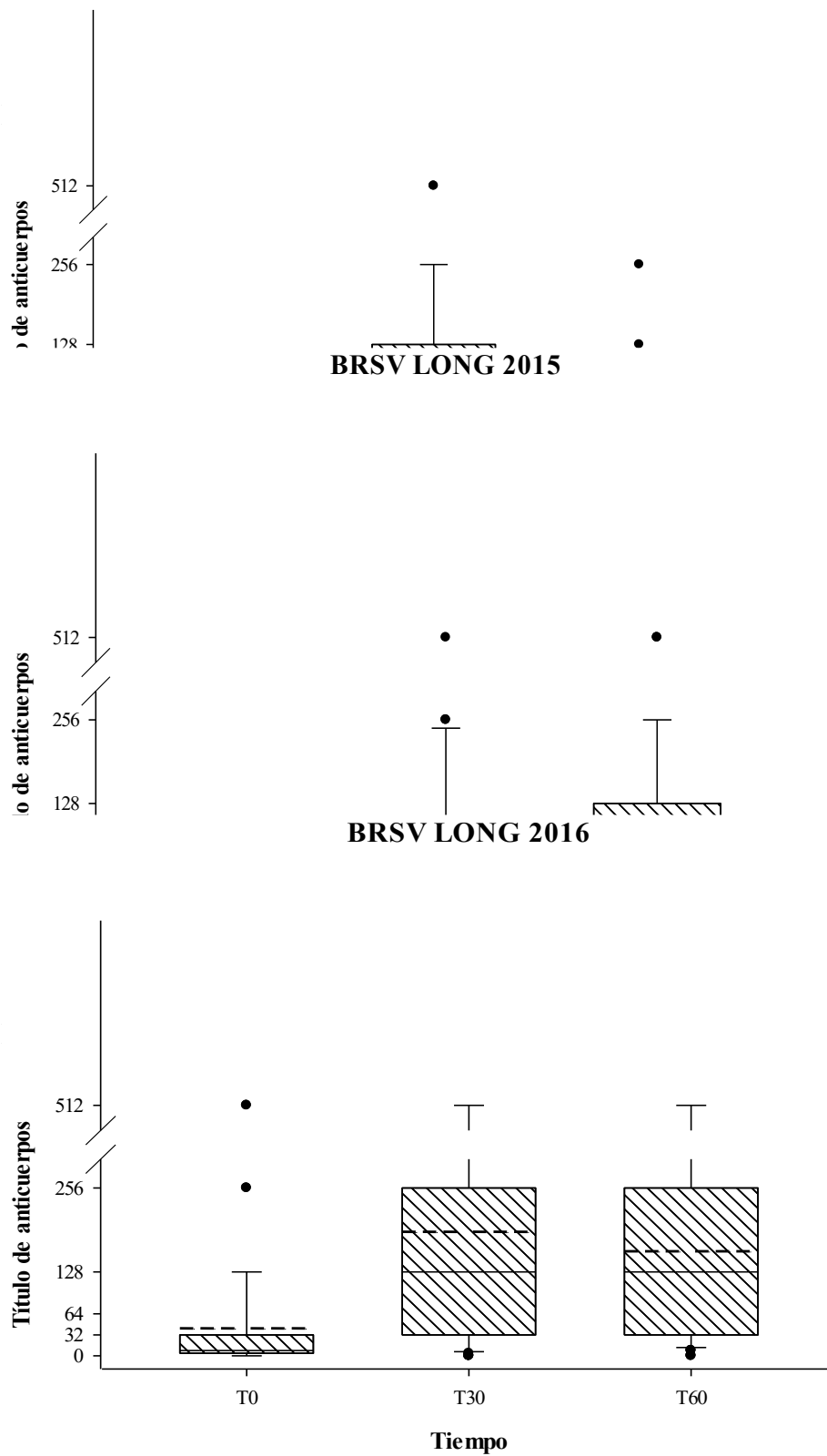
La seroprevalencia para BRSV en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), y en los tiempos T30 y T60 se muestra en la tabla 2.3. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.4 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.5.

**Tabla 2.3.** Seroprevalencia para BRSV en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

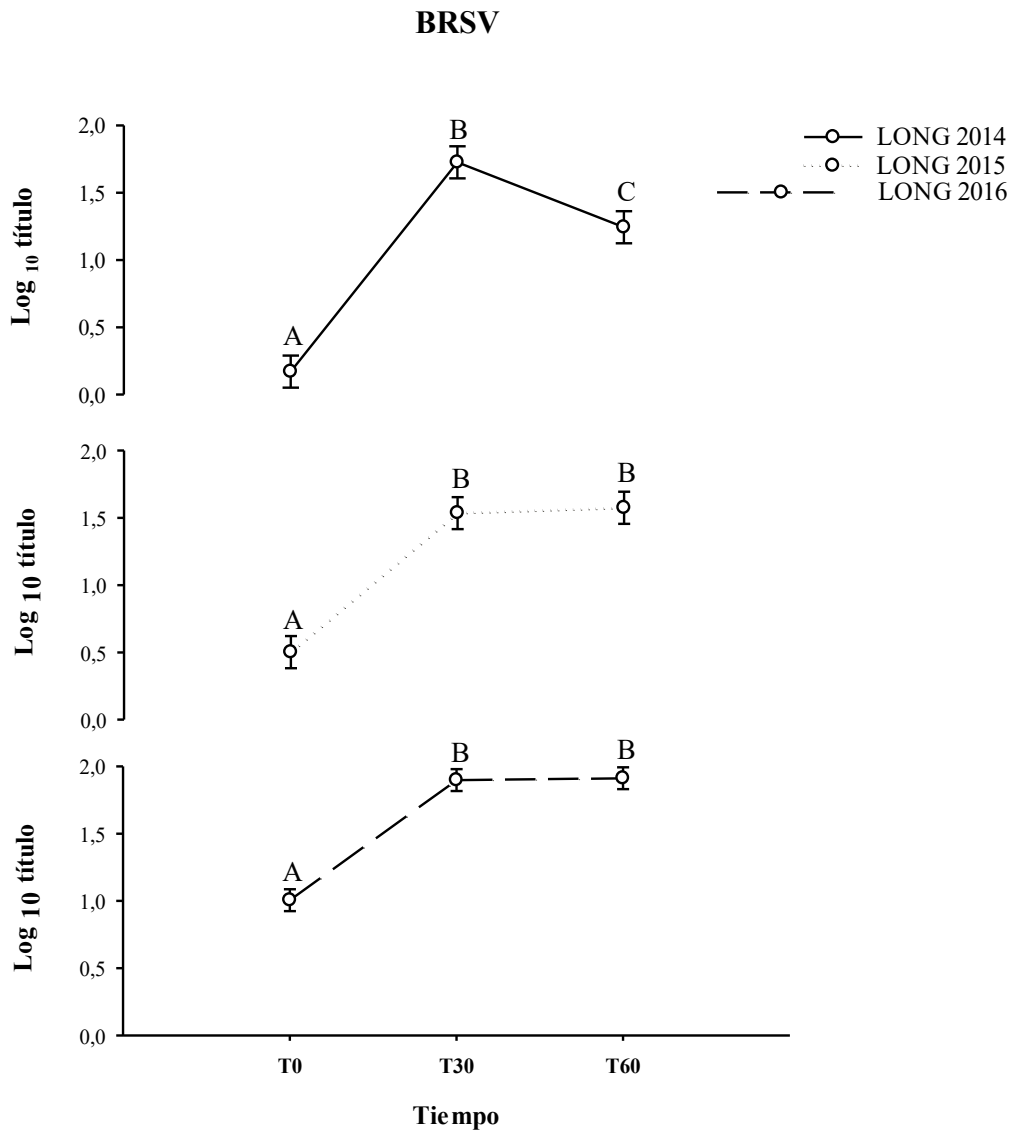
	<b>Seroprevalencia BRSV (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	16	100	93
<b>LONG 2015</b>	47	100	97
<b>LONG 2016</b>	77	92	97

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).





**Figuras 2.4 (a-c).** Título de anticuerpos anti BRSV en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014 (a), 2015 (b) y 2016 (c); durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.5.** Media de los mínimos cuadrados (Log<sub>10</sub>) de los títulos de anticuerpos anti BRSV hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ). LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).

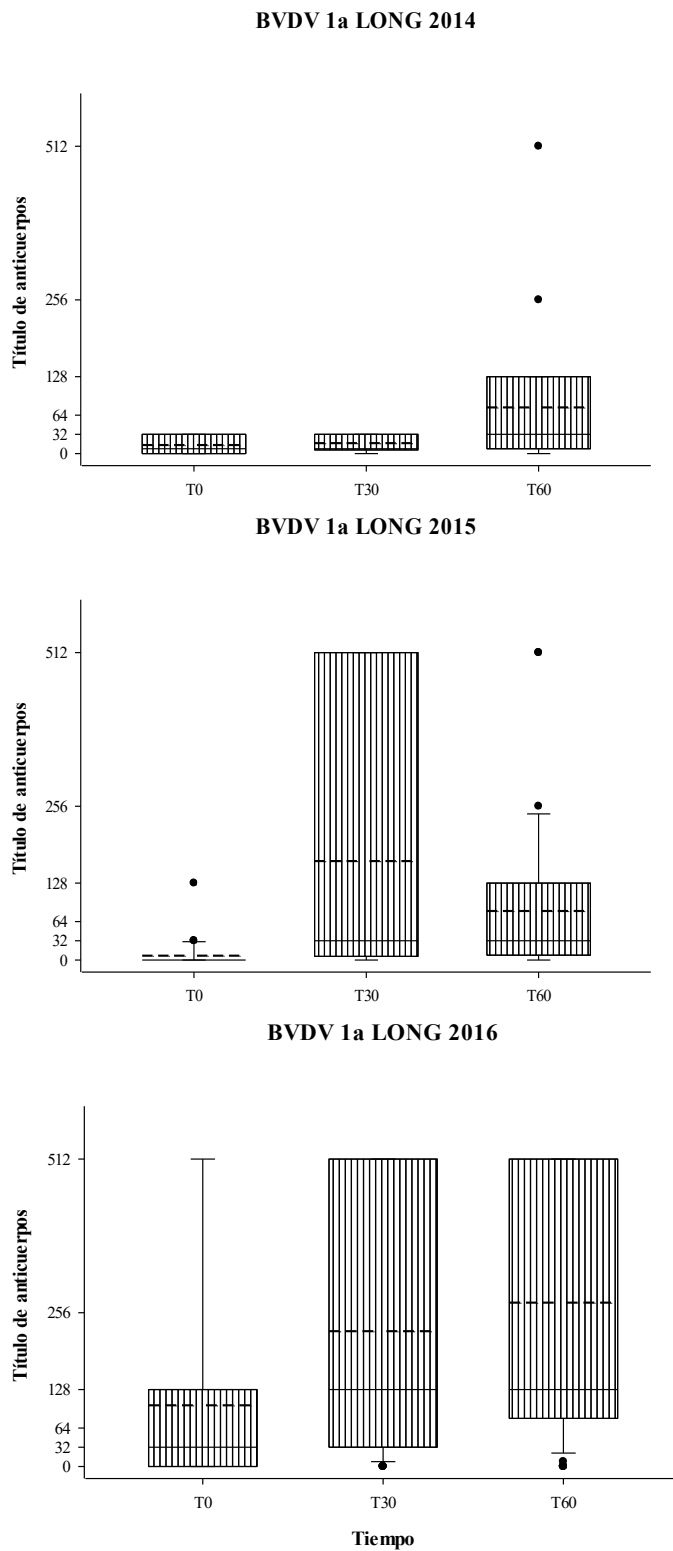
### 3.2.2 Serología BVDV 1a

La seroprevalencia para BVDV 1a en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), y en los tiempos T30 y T60 se muestra en la tabla 2.4. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.6 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.7.

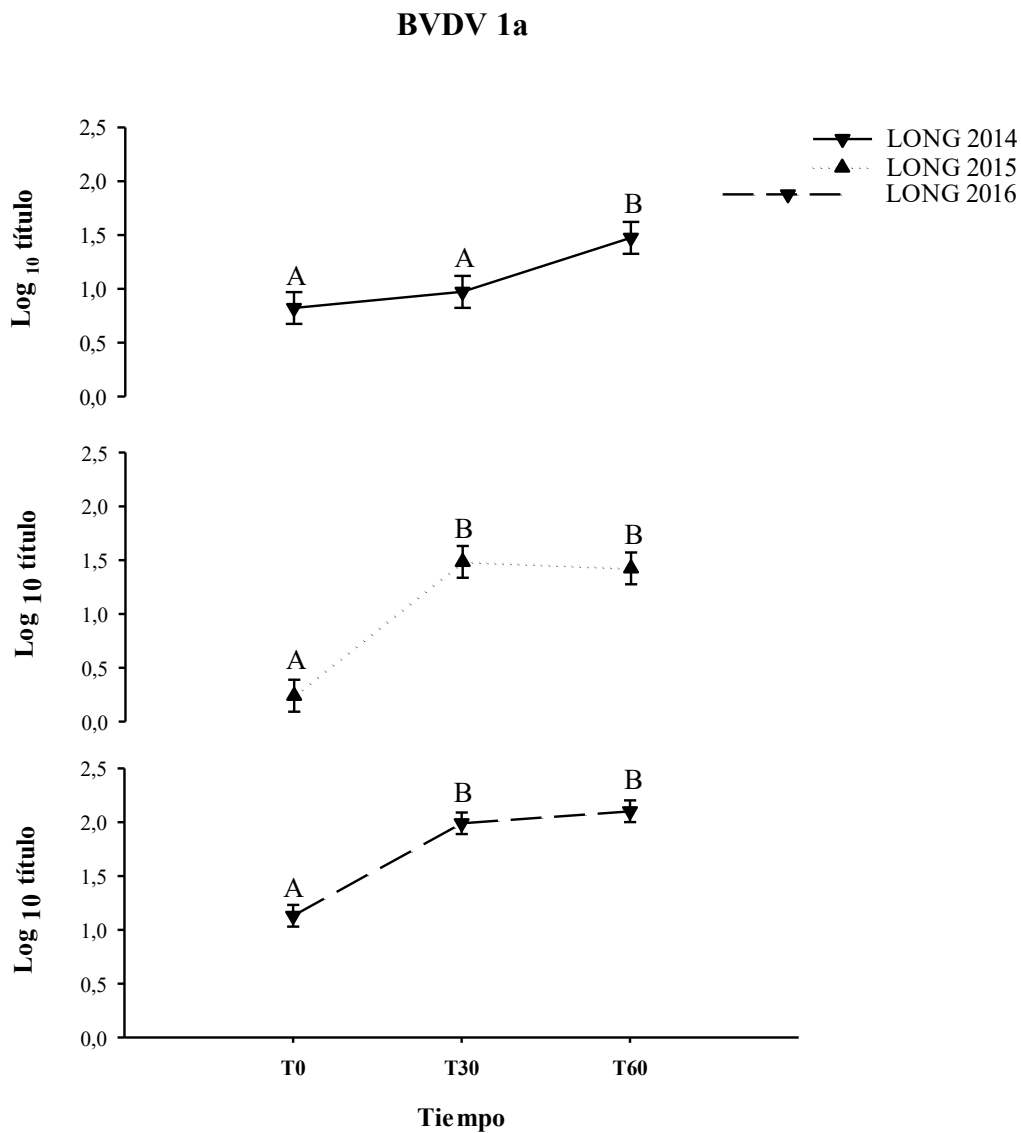
**Tabla 2.4.** Seroprevalencia para BVDV 1a en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

	<b>Seroprevalencia BVDV 1a (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	67	77	87
<b>LONG 2015</b>	17	80	100
<b>LONG 2016</b>	58	92	94

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).



**Figuras 2.6 (a-c).** Título de anticuerpos anti BVDV 1a en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014 (a), 2015 (b) y 2016 (c), durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.7.** Media de los mínimos cuadrados (Log<sub>10</sub>) de los títulos de anticuerpos anti BVDV 1a hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ). LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).

### 3.2.3 Serología BVDV 1b

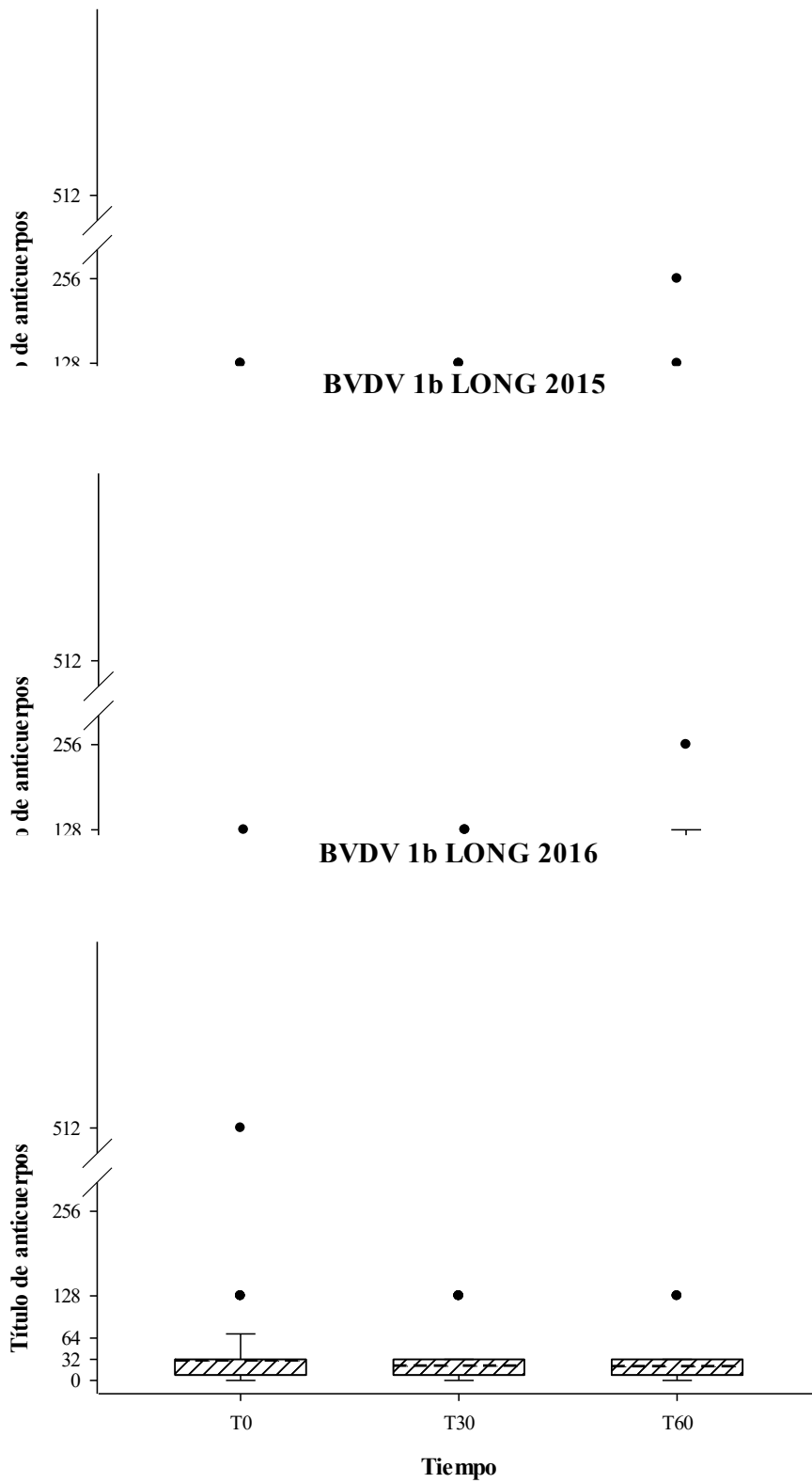
La seroprevalencia para BVDV 1b en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), T30 y T60 se muestra en la tabla 2.5. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.8 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.9.

**Tabla 2.5.** Seroprevalencia para BVDV 1b en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

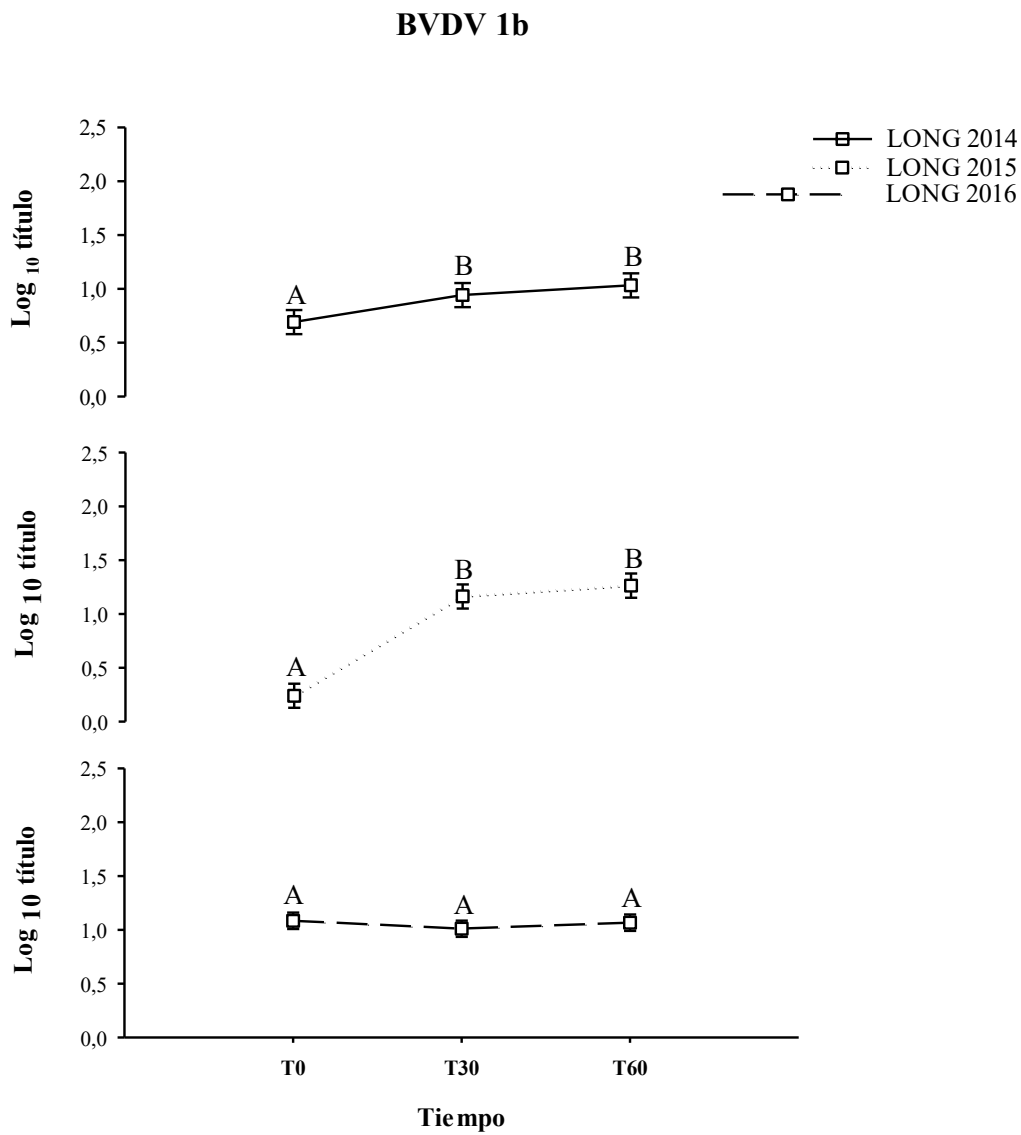
	<b>Seroprevalencia BVDV 1b (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	50	67	73
<b>LONG 2015</b>	17	97	100
<b>LONG 2016</b>	89	83	88

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).





**Figuras 2.8 (a-c).** Título de anticuerpos anti BVDV 1b en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014 (a), 2015 (b) y 2016 (c); durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.9.** Media de los mínimos cuadrados (Log10) de los títulos de anticuerpos anti BVDV 1b hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ). LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).

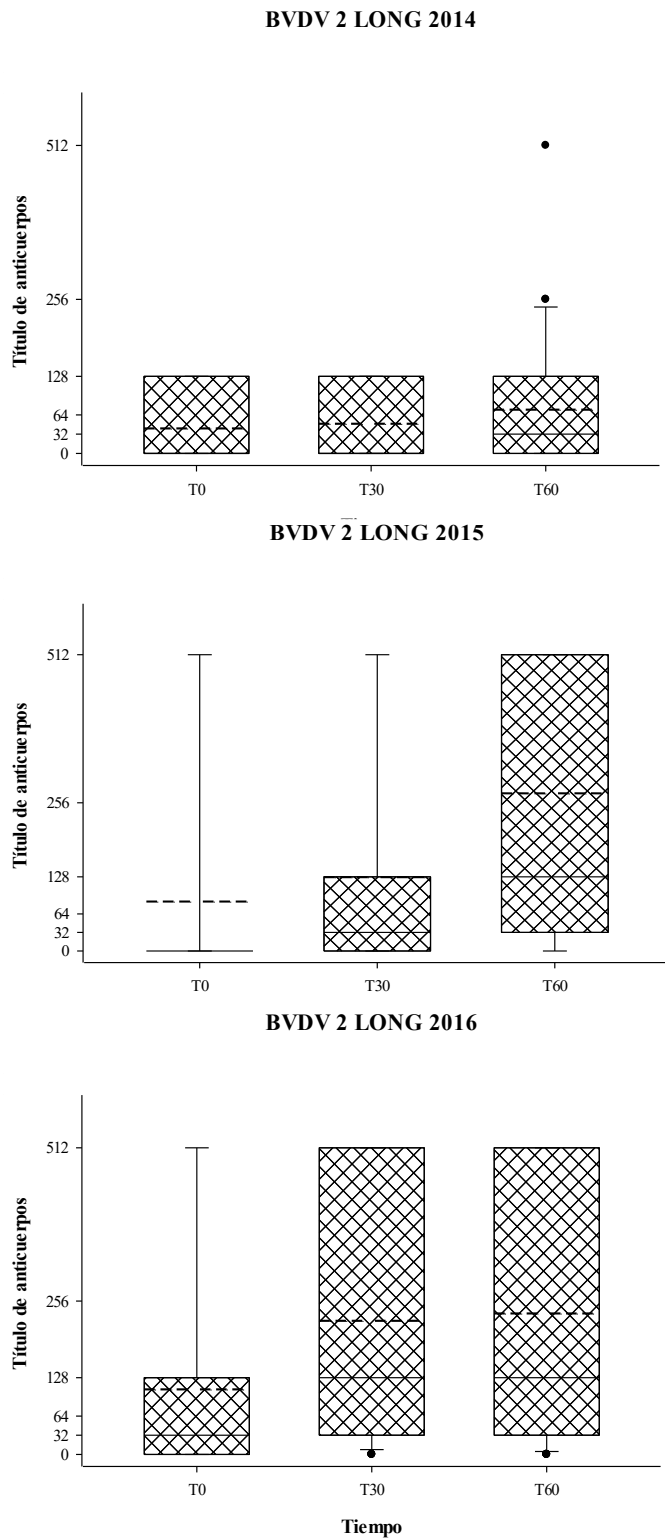
### 3.2.4 Serología BVDV 2

La seroprevalencia para BVDV 2 en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), T30 y T60 se muestra en la tabla 2.6. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.10 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.11.

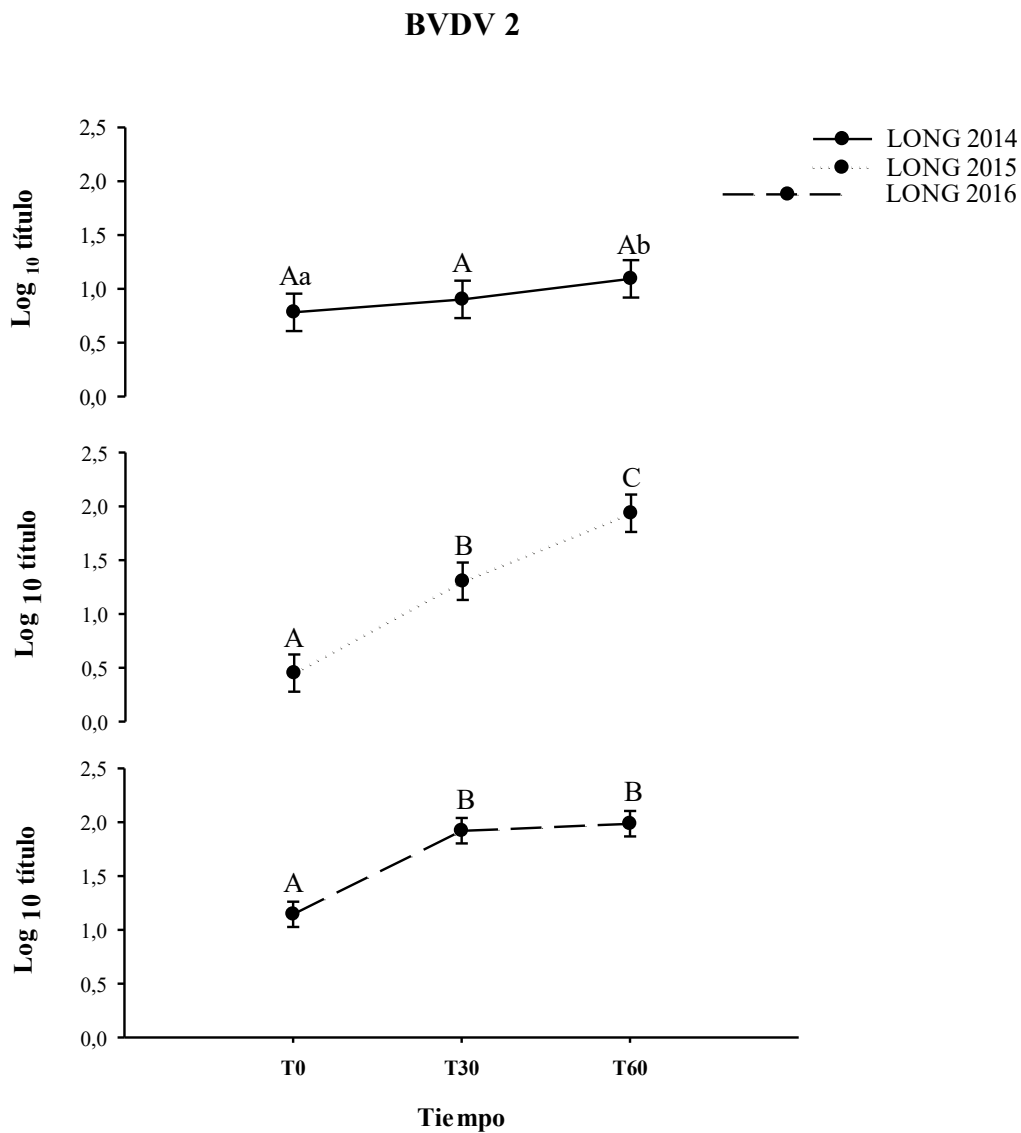
**Tabla 2.6.** Seroprevalencia para BVDV 2 en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

	<b>Seroprevalencia BVDV 2 (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	40	47	57
<b>LONG 2015</b>	17	80	97
<b>LONG 2016</b>	60	92	92

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).



**Figuras 2.10 (a-c).** Título de anticuerpos anti BVDV 2 en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014 (a), 2015 (b) y 2016 (c); durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales); LONG 2015 (n=30 animales); LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.11.** Media de los mínimos cuadrados (Log<sub>10</sub>) de los títulos de anticuerpos anti-BVDV 2 hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ), letras minúsculas diferentes indican tendencias ( $P$  entre 0,051 - 0,1). LONG 2014 ( $n=30$  animales). LONG 2015 ( $n=30$  animales). LONG 2016 ( $n=65$  animales).

### 3.2.5 Serología BPIV-3

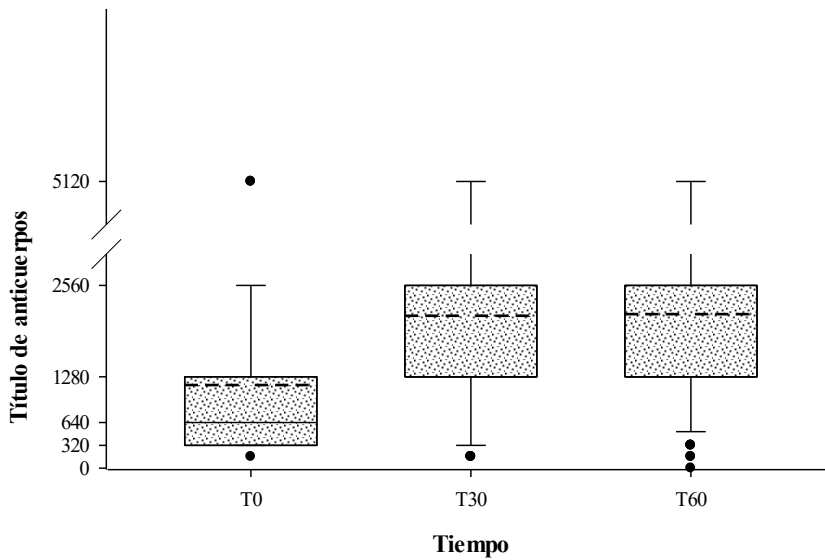
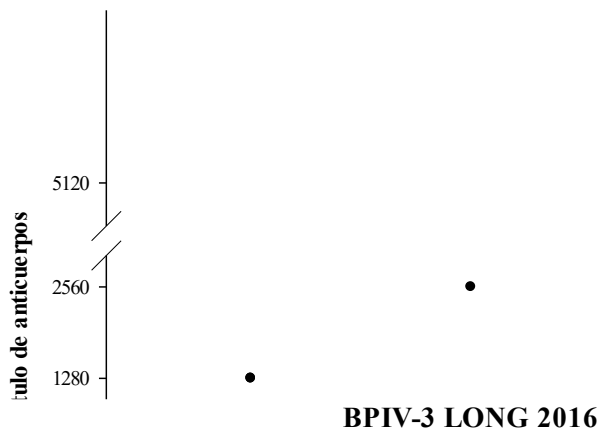
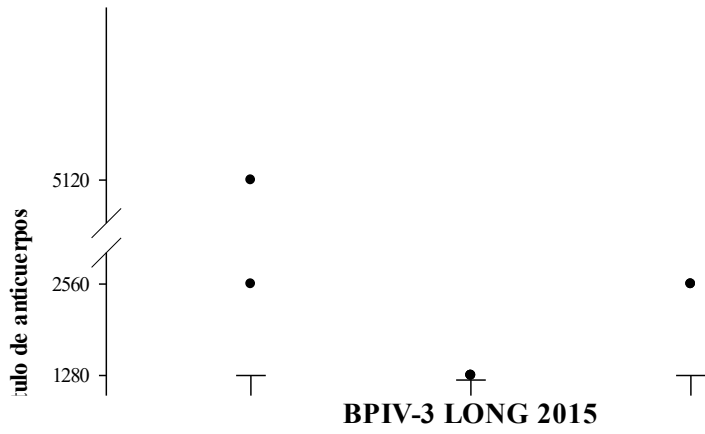
La seroprevalencia para BPIV-3 en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), T30 y T60 se muestra en la tabla 2.7. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.12 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.13.

**Tabla 2.7.** Seroprevalencia para BPIV-3 en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

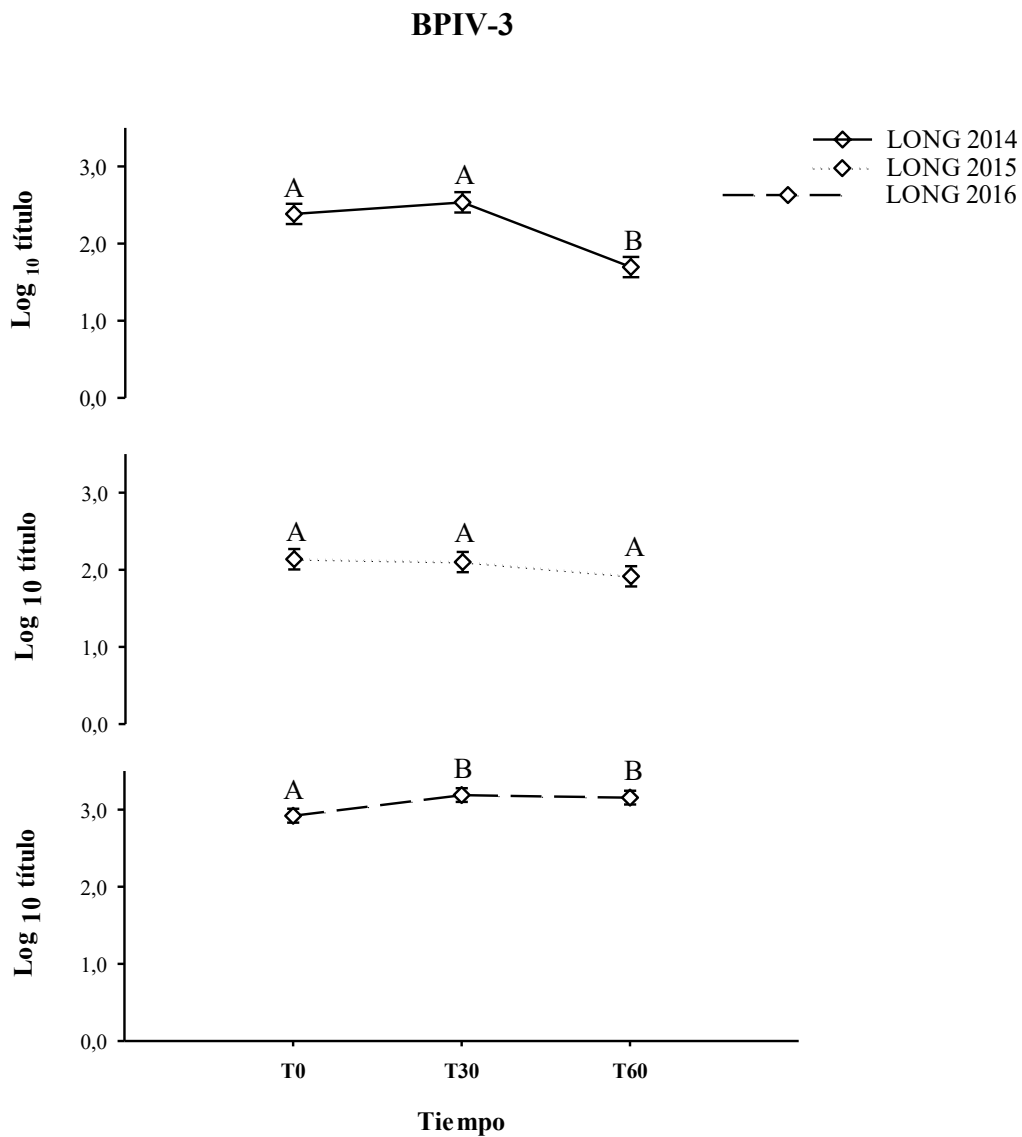
	<b>Seroprevalencia BPIV-3 (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	10	100	37
<b>LONG 2015</b>	87	90	93
<b>LONG 2016</b>	100	100	100

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).





**Figuras 2.12 (a-c).** Título de anticuerpos anti BPIV-3 en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014, 2015 y 2016; durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales); LONG 2015 (n=30 animales); LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.13.** Media de los mínimos cuadrados (Log10) de los títulos de anticuerpos anti BPIV-3 hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ). LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).

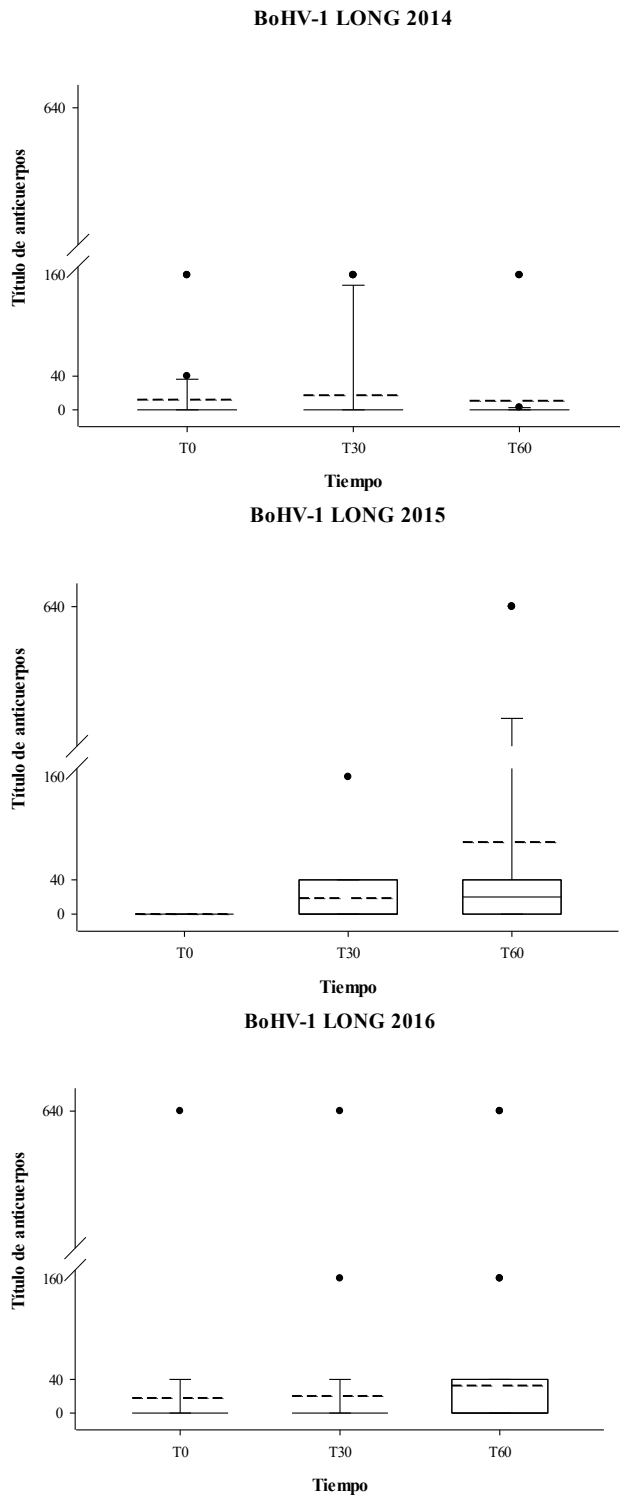
### 3.2.6 Serología BoHV1

La seroprevalencia para BoHV1 en cada uno de los estudios longitudinales al arribo (T0), T30 y T60 se muestra en la tabla 2.8. Los títulos de Ac (inversa de la máxima dilución) de los estudios LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016 en los T0, T30 y T60 se presentan en la figura 2.14 (a-c). Por último, la media de los mínimos cuadrados de los títulos normalizados (Log10) para los mismos ensayos y tiempos de muestreo se presentan en la figura 2.15.

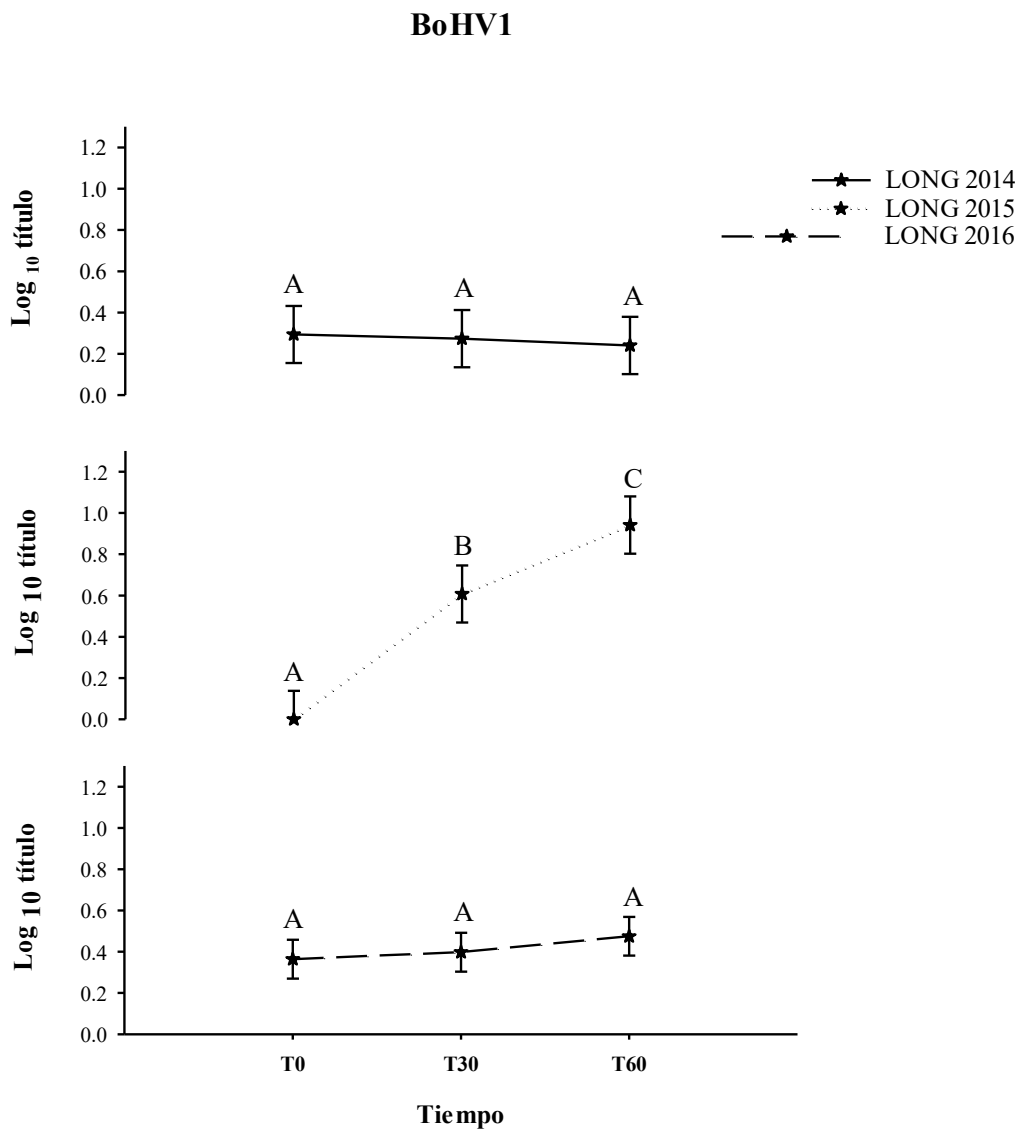
**Tabla 2.8.** Seroprevalencia para BoHV1 en los estudios longitudinales de los muestreos realizados en los tiempos T0, T30 y T60.

	<b>Seroprevalencia BoHV1 (%)</b>		
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>
<b>LONG 2014</b>	13	13	10
<b>LONG 2015</b>	0	37	50
<b>LONG 2016</b>	22	23	26

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).



**Figuras 2.14 (a-c).** Título de anticuerpos anti BoHV1 en terneros ingresados a engorde a corral en los estudios longitudinales 2014 (a), 2015 (b) y 2016 (c); durante los primeros 60 días de estadía. LONG 2014 (n=30 animales); LONG 2015 (n=30 animales); LONG 2016 (n=65 animales). T0 día del ingreso al engorde a corral.



**Figura 2.15.** Media de los mínimos cuadrados (Log10) de los títulos de anticuerpos anti BoHV1 hallados en los tres estudios longitudinales.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0,05$ ). LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).

### 3.2.7 Seroconversiones

El 93, 94 y 97% de los animales seroconvirtieron para uno o más de los virus estudiados, en los primeros 60 días de ingresados al EC, durante los ensayos LONG 2015, LONG 2016 y LONG 2014 respectivamente. Los porcentajes de seroconversión para cada uno de los virus, en cada uno de los estudios se presentan en la tabla 2.9.

Los animales seroconvertidos agrupados en los diferentes períodos (T0-T30, T30-T60 y T0-T60) para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 se presentan en la figura 2.16 (a-f).

La seroconversión para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1, en función de los títulos de Ac (título bajo/alto) al ingreso del EC, se presentan en la tabla 2.10.

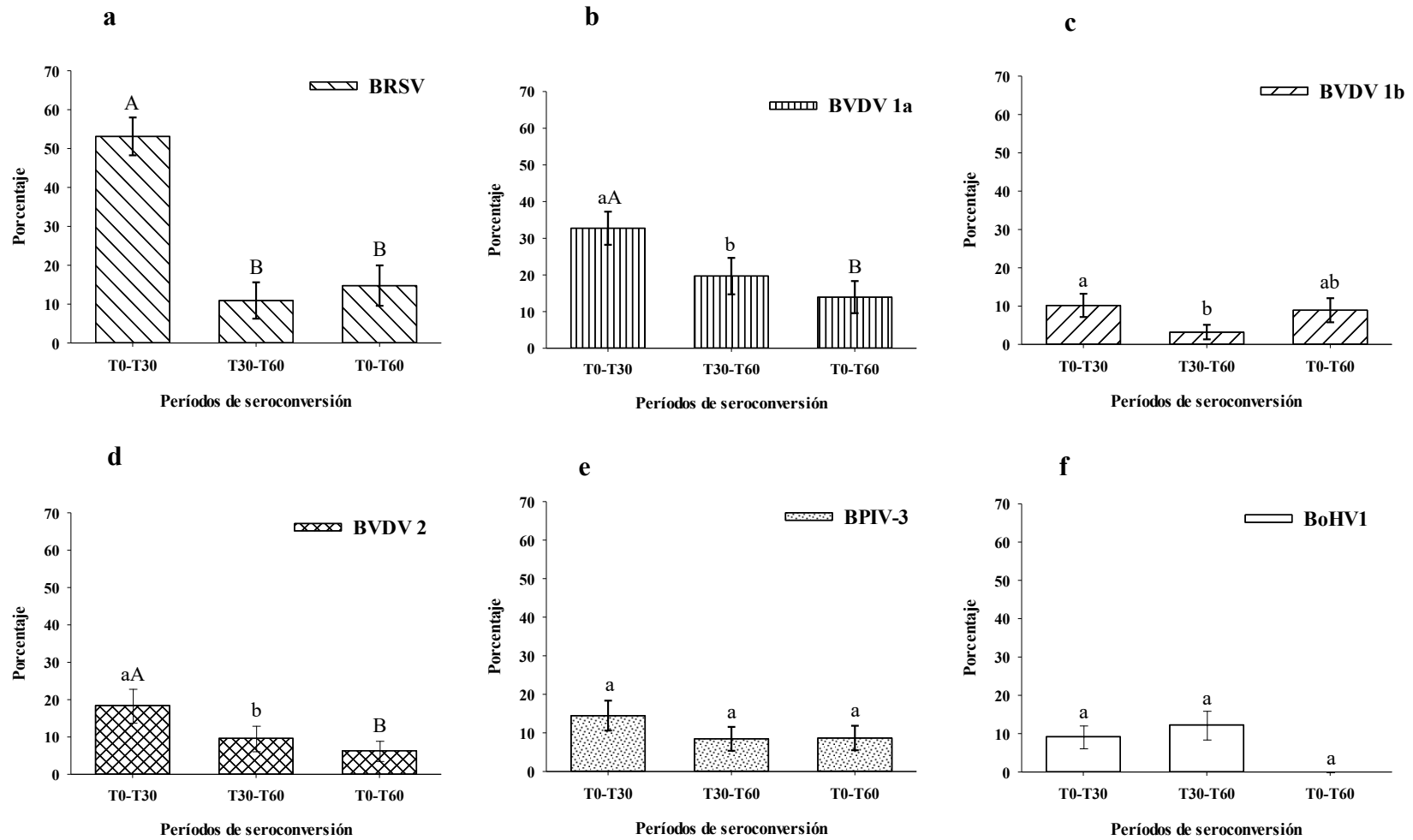
Por último, en cada uno de los ensayos se encontraron animales que no presentaron seroconversión a ningún virus y animales hasta con 5 combinaciones (Figura 2.17). Resultó frecuente el hallazgo de seroconversiones para dos o más virus con porcentajes del 67% en el LONG 2016, 73% en el LONG 2014 y 90% en el LONG 2015.

**Tabla 2.9.** Porcentajes de seroconversión para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 en los estudios longitudinales LONG 2014, LONG 2015 y LONG 2016.

	<b>Seroconversión (%)</b>					
	<b>BRSV</b>	<b>BVDV 1a</b>	<b>BVDV 1b</b>	<b>BVDV 2</b>	<b>BPIV-3</b>	<b>BoHV1</b>
<b>LONG 2014</b>	80	43	17	7	30	7
<b>LONG 2015</b>	57	73	60	67	10	60
<b>LONG 2016</b>	51	40	6	43	51	15

LONG 2014 (n=30 animales). LONG 2015 (n=30 animales). LONG 2016 (n=65 animales).





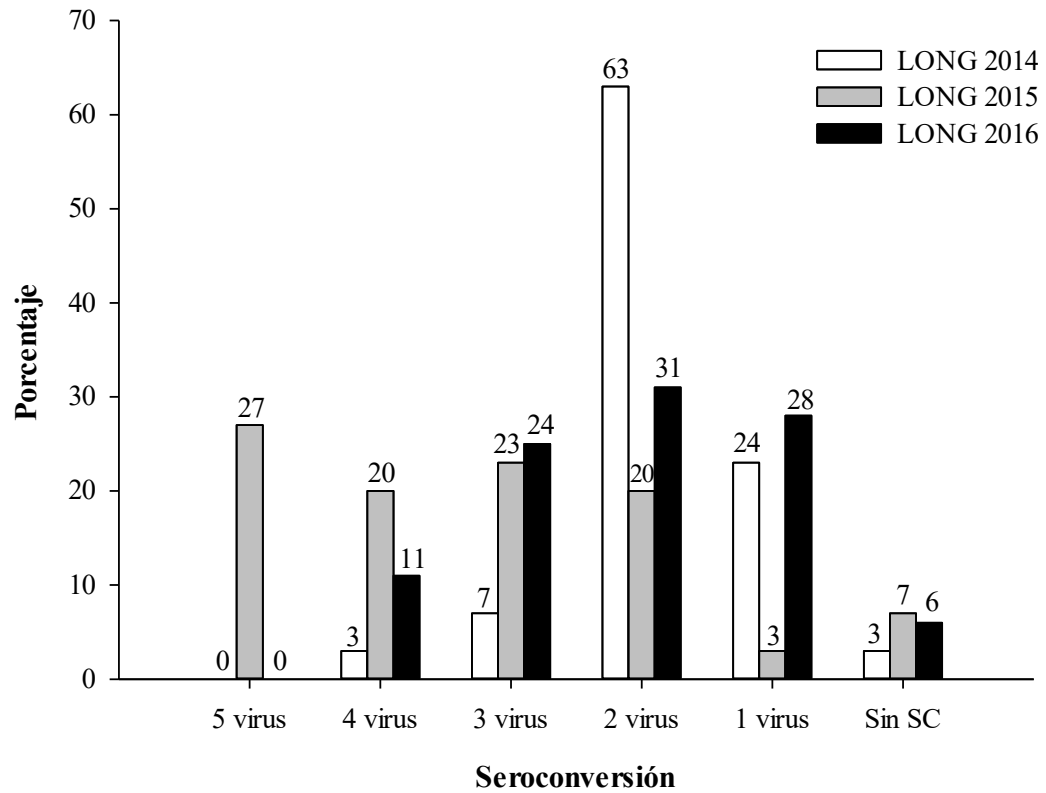
**Figura 2.16 (a-f).** Medias de los mínimos cuadrados (%) de los animales seroconvertidos para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 durante los periodos T0-T30, T30-T60 y T0-T60 (n=125) de los estudios longitudinales realizados.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), letras minúsculas diferentes indican tendencias ( $P$  entre 0,051 - 0,1).

**Tabla 2.10.** Asociación entre título de anticuerpos al ingreso del engorde a corral y seroconversión para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1.

Título de Ac al ingreso (T0)*	Seroconversión											
	BRSV		BVDV 1a		BVDV 1b		BVDV 2		BPIV-3		BoHV1	
	n**	valor de P	n	valor de P	n	valor de P	n	valor de P	n	valor de P	n	valor de P
<b>Bajo</b>	113 (74)	<0,001	103 (61)	<0,001	116 (26)	0,420	89 (49)	<0,001	60 (30)	0,004	121 (30)	0,253
<b>Alto</b>	12 (0)		22 (0)		9 (1)		36 (1)		65 (16)		4 (0)	

Valores de  $P < 0,001$  fueron considerados altamente significativos, valores de  $P < 0,05$  fueron considerados significativos. \* Se consideró bajo título de anticuerpos a aquellos animales con valores  $\leq$  a 32 (BRSV y BVDV),  $\leq$  a 320 UIHA (BPIV-3) y  $\leq$  a 40 (BoHV1). Títulos de anticuerpos con valores mayores a los mencionados para cada virus fueron considerados altos. \*\* Número de animales incluidos en el análisis ( $n=125$ ), el valor entre paréntesis representa el número de animales que presenta el evento (seroconversión).

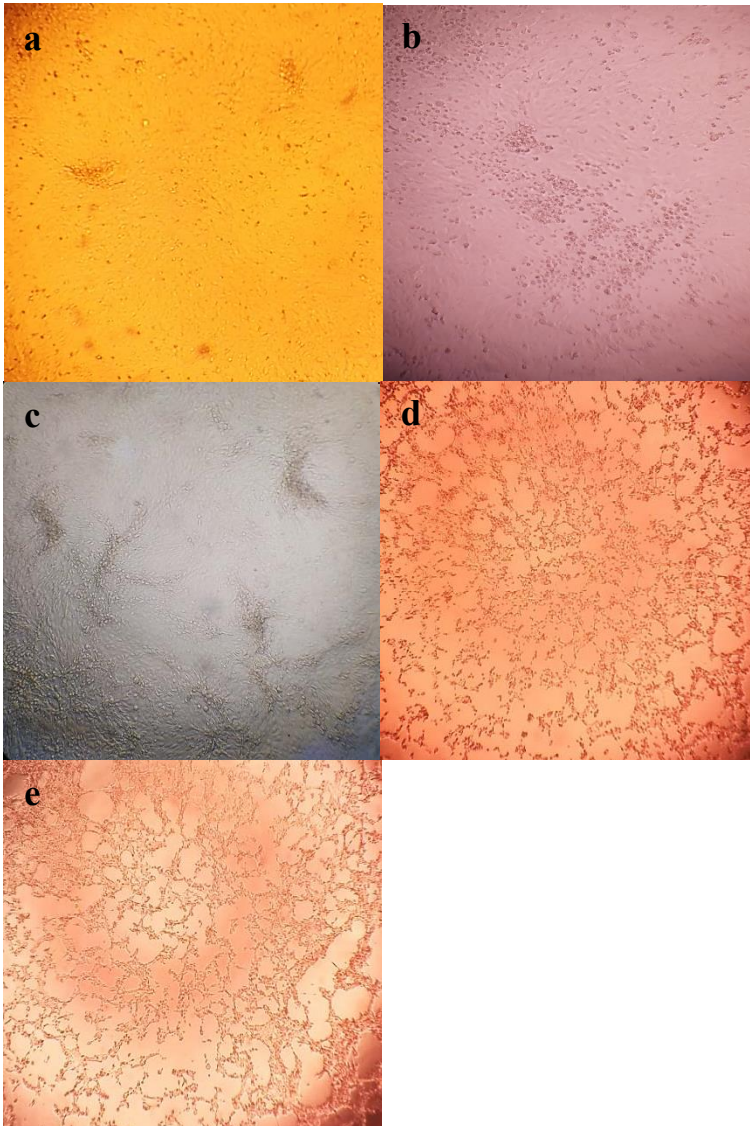


**Figura 2.17.** Animales sin y con seroconversión para uno o más de los virus involucrados en la ERB en tres estudios longitudinales en los primeros 60 días de ingresados al engorde a corral. Sin SC: animales que no presentaron seroconversión para ninguno de los virus estudiados.

### **3.3 Virología**

#### **3.3.1 Aislamiento viral en cultivo de células (hisopados nasales T0, T15 y T30)**

Del total de los 375 hisopos procesados provenientes de los 3 ensayos longitudinales, 164 presentaron ECP visible al microscopio óptico, 68 no presentaron ECP y 143 presentaron cambios en la monocapa por efecto tóxico lo que impidió su evaluación. Las células inoculadas mostraron ECP compatibles con un único virus (figuras 2.18 a-e) o más de un virus concomitantemente.



**Figura 2.18 (a-e).** Monocapas de células MDBK con ECP compatible con BVDV 1a (a), BVDV 1b (b), BVDV 2 (c), BPIV-3 (d) y BoHV1 (e).

Los resultados de la detección viral, mediante técnicas de biología molecular, realizada en los distintos ensayos (LONG 2014, 2015 y 2016) a partir de *pools* de hisopados nasales (T0, T15 y T30), que exhibieron o no ECP observable al microscopio óptico por la técnica de aislamiento en cultivos celulares en monocapa, se presentan en la tabla 2.11.

**Tabla 2.11.** Detección viral mediante técnicas moleculares en *pools* de muestras de hisopados nasales realizados en los ensayos longitudinales 2014, 2015 y 2016<sup>1</sup> en los tiempos T0, T15 y T30.

<b>LONG 2014</b>	<b>T0 (n=5)</b>	<b>T15 (n=5)</b>	<b>T30 (n=6)</b>
<b>BRSV</b>	-	-	-
<b>BVDV</b>	-	-	+ (n=2)
<b>BPIV-3</b>	+ (n=2)	+ (n=3)	+ (n=3)
<b>BoHV1</b>	-	-	-
<b>LONG 2015</b>	<b>T0 (n=4)</b>	<b>T15 (n=4)</b>	<b>T30 (n=5)</b>
<b>BRSV</b>	-	-	-
<b>BVDV</b>	-	-	-
<b>BPIV-3</b>	+ (n=1)	+ (n=3)	+ (n=2)
<b>BoHV1</b>	-	-	-
<b>LONG 2016</b>	<b>T0 (n=6)</b>	<b>T15 (n=8)</b>	<b>T30 (n=4)</b>
<b>BRSV</b>	-	-	-
<b>BVDV</b>	+ (n=1)	+ (n=1)	+ (n=1)
<b>BPIV-3</b>	+ (n=1)	+ (n=2)	+ (n=3)
<b>BoHV1</b>	+ (n=3)	+ (n=7)	+ (n=1)

<sup>1</sup> *pool* formado por un máximo de 5 muestras cada uno. +: *pool* positivo (n=cantidad de *pools* positivos). -: negativo.

### **3.3.2 Técnicas moleculares a partir de hisopados nasales de animales con conversión serológica**

Los resultados de las técnicas moleculares para los diferentes virus en animales con conversión serológica se presentan en la tabla 2.12.



**Tabla 2.12.** Animales positivos por técnicas moleculares en hisopados nasales para cada uno de los virus estudiados que presentaron seroconversión en los ensayos longitudinales 2014, 2015 y 2016.

	<b>n seroconvertidos<sup>1</sup></b>	<b>n positivos<sup>2</sup></b>
<b>LONG 2014</b>		
<b>BRSV</b>	24	2
<b>BVDV<sup>3</sup></b>	20	2
<b>BPIV-3</b>	9	0
<b>BoHV1</b>	2	0
<b>LONG 2015</b>		
<b>BRSV</b>	17	1
<b>BVDV<sup>3</sup></b>	60	3
<b>BPIV-3</b>	3	0
<b>BoHV1</b>	18	0
<b>LONG 2016</b>		
<b>BRSV</b>	33	7
<b>BVDV<sup>3</sup></b>	58	8
<b>BPIV-3</b>	33	0
<b>BoHV1</b>	10	0

<sup>1</sup> número de animales seroconvertidos. <sup>2</sup> total de animales positivos por técnicas moleculares en hisopados nasales para cada uno de los virus estudiados. <sup>3</sup> incluye los animales seroconvertidos para BVDV 1a, BVDV 1b y BVDV 2.

Los 5 animales elegidos para realizar secuenciación y genotipificación de BVDV fueron: 4 animales con infección aguda provenientes del LONG 2014 (n=2) y LONG 2015 (n=2) y 1 animal persistentemente infectado del LONG 2016. Todas las muestras, correspondieron con cepas genotipo BVDV 1 subgenotipo b (Tabla 2.13).

**Tabla 2.13.** Resultados de la genotipificación realizada a 5 muestras positivas a BVDV.

<b>Muestra</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Genotipo</b>
<b>M4<sup>1</sup></b>	LONG 2014	BVDV 1b
<b>M6<sup>1</sup></b>	LONG 2014	BVDV 1b
<b>A797<sup>1</sup></b>	LONG 2015	BVDV 1b
<b>129<sup>1</sup></b>	LONG 2015	BVDV 1b
<b>149<sup>2</sup></b>	LONG 2016	BVDV 1b

<sup>1</sup>animales con infección aguda. <sup>2</sup>animal persistentemente infectado.

### **3.3.3 Animales persistentemente infectados para BVDV**

Siete animales resultaron negativos por SN en los tiempos T0, T30 y T60 para alguno de los genotipos de BVDV. Sin embargo, uno de estos animales fue positivo en la evaluación de sus 3 hisopados nasales (T0, T15 y T30) y suero, confirmándose su característica de persistentemente infectado (PI). Este animal perteneció al LONG 2016 y fue elegido para realizar la genotipificación, resultando positivo a la cepa del genotipo BVDV 1 subgenotipo b (Tabla 2.13). Los restantes (n=6) resultaron, entonces, animales seronegativos que no tuvieron contacto con el virus.

### **3.3.4 Animales con ERB clínica**

En los LONG 2015 y 2016 se registraron n=2 y n=4 animales con enfermedad clínica, respectivamente; en el ensayo LONG 2014 no se registró ningún animal. Los resultados de las técnicas de biología molecular realizadas a partir de los hisopos nasales, BAL, sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con hisopos nasales y BAL y la seroconversión para cada virus en los animales con ERB clínica, se presentan en la tabla 2.14.

**Tabla 2.14.** Animales con ERB clínica durante los ensayos longitudinales (LONG). Resultados de las técnicas de biología molecular realizadas a partir de hisopos nasales, BAL, sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con hisopos nasales y BAL. Seroconversión para BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1.

ID	LONG	Estudios moleculares (PCR, RT-PCR y RT-nPCR)				Seroconversiones					
		BRSV	BVDV	BPIV-3	BoHV1	BRSV	BVDV 1a	BVDV 1b	BVDV 2	BPIV-3	BoHV1
122	2015	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>d</sup>	-	+	+	+	+	-	+
A091	2015	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	+	-
5	2016	+ <sup>a</sup>	-	+ <sup>cd</sup>	-	+	+	-	-	+	-
14	2016	-	-	+ <sup>cd</sup>	-	-	-	-	+	+	-
41	2016	+ <sup>ab</sup>	-	-	-	+	+	-	-	-	-
49	2016	-	+ <sup>a</sup>	-	-	+	+	+	+	-	-

LONG: estudio longitudinal. ID: identificación. +: positivo. -: negativo. <sup>a</sup> hisopo nasal obtenido en el momento de detección de ERB clínica. <sup>b</sup> lavado broncoalveolar (BAL) obtenido en el momento de detección de ERB clínica. <sup>c</sup> sobrenadante de cultivo (5° pasaje) a partir de hisopo nasal obtenido en el momento de detección de ERB clínica. <sup>d</sup> sobrenadante de cultivo (5° pasaje) a partir de lavado broncoalveolar (BAL) obtenido en el momento de detección de ERB clínica.

## **4. DISCUSIÓN**

En los estudios LONG se pudo establecer, por diferentes técnicas, la presencia de todos los virus involucrados en la ERB en establecimientos de EC de Argentina. Las principales características de los diferentes ensayos se discuten a continuación.

### **4.1 Incidencia**

La presencia de animales que padecen ERB en establecimientos de EC se encuentra asociada a diferentes factores de riesgo (Cusack y col., 2003). En cuanto al EC, el mayor tamaño de establecimiento y la densidad animal en el corral son factores de importancia (Taylor y col., 2010). Por otro lado, viajes prolongados, mezcla de animales de diferentes orígenes y pasaje de los mismos por un mercado concentrador, son también factores de importancia en la presentación de la enfermedad (Cusack y col., 2003; Taylor y col., 2010; Moore y col., 2015). En el presente estudio, las diferencias encontradas en la morbilidad (0% a 6,6%) en los LONG son difíciles de explicar, ya que pueden haber interactuado varios factores. Es de destacar que el bajo peso corporal al ingreso se menciona como uno de los factores de riesgo más importantes a tener en cuenta para la presentación de la ERB (Martin y col., 1989). Sin embargo, los animales del ensayo LONG 2014, que fueron los que presentaron menor peso corporal al ingreso y más kilómetros recorridos hasta llegar a destino, no manifestaron signos clínicos de ERB (LONG 2014). En los ensayos donde se observó enfermedad clínica (LONG 2015 y 2016), se identificaron como factores de riesgo en común para ambos períodos estudiados, la mezcla de lotes de

diferentes orígenes y el pasaje por un mercado concentrador (remate feria), situaciones que pudieron haber favorecido la presentación de la enfermedad.

En Argentina, existen escasos datos sobre porcentajes de morbilidad para ERB en EC. Estudios previos de nuestro grupo informaron valores de 7,95% y 10,83% en los primeros 50 días de engorde (Fazzio y col., 2015; Galvan y col., 2019) siendo algo más altos que los encontrados, en este estudio, en los ensayos LONG 2015 y 2016. El porcentaje de enfermos observado en nuestro estudio, si bien resulta similar a lo descrito en países vecinos (6,13% - Lopes Baptista y col., 2017), no puede compararse con lo reportado en otras partes del mundo donde los resultados son muy variables. En EE.UU. se informan porcentajes de morbilidad que van desde el 8,17% (Schneider y col., 2009) al 14,7% (Fulton y col., 2009) y 16,2% (USDA, 2011). A su vez se describen diferencias territoriales regionales, como por ejemplo la región central de EE.UU. presentó dos veces más morbilidad (17,9%) que el resto de los EC de ese país (8,8%) (Avra y col., 2017). En Canadá, un estudio que analizó la morbilidad en EC durante 3 años, reveló un amplio rango (6 al 67%) con prevalencias de enfermedad diferentes según año, grupo y localización geográfica (Martin y col., 1989). Estas diferencias entre países, años y establecimientos muchas veces son difíciles de interpretar, o conducen a comparaciones no del todo confiables, ya que los métodos utilizados para la definición de “caso clínico” difieren entre estudios. En este sentido, algunos autores consideran el concepto de “fiebre indiferenciada aguda en EC” como signo válido para calificar a los animales como clínicamente enfermos por ERB (Radostits y col., 2007; Booker y col., 2017). Sin embargo, la fiebre indiferenciada aguda incluye, en sentido estricto, animales con temperatura rectal

mayor a 40 °C, que puede tomar origen en otras entidades no asociadas a ERB (Booker y col., 1999, 2017).

#### 4.2 Diagnóstico clínico

La detección temprana de animales con ERB clínica es uno de los objetivos principales en la rutina diaria de los establecimientos de EC. Detectar animales en estadios iniciales de enfermedad mejora las posibilidades de éxito terapéutico (Radostits y col., 2007). Sin embargo, discernir entre animales sanos y enfermos (con ERB) resulta un desafío, ya que la capacidad de diagnóstico clínico es relativamente baja. White y Renter (2009) concluyeron que el método de diagnóstico clínico de rutina, para la detección de animales con ERB, presenta una sensibilidad y especificidad del 62% y 63%, respectivamente. Por su parte Schaefer y col., (2007) mostraron que las técnicas tradicionales de *score* clínico poseen un valor predictivo positivo, negativo y eficiencia del 70%, 45% y 55%, respectivamente. En EC este tipo de diagnóstico se basa principalmente en signos clínicos subjetivos tales como la depresión, disnea, taquipnea y, como único parámetro clínico objetivo, la hipertermia (Sanderson y col., 2008; Babcock y col., 2010). El criterio clínico propuesto por Hanzlicek y col., (2010) utilizado en este trabajo, es similar a los mencionados anteriormente, y al analizar nuestros resultados puso de manifiesto las mismas limitaciones. En este sentido, el diagnóstico del 50% de los animales con ERB clínica (3/6) se realizó en la etapa del *score* clínico más bajo (*score* 2) mientras que el resto de los animales enfermos recién se detectaron con los signos correspondientes al *score* 3. La depresión es, bajo el criterio utilizado, el signo clínico temprano de ERB.



Una posible explicación a la falta de sensibilidad en la detección clínica de ERB podría estar relacionada con la propia especie animal, ya que los bovinos durante el encierro en el EC, perciben a las personas como “predadores” y tienden a disimular los signos clínicos de debilidad (Noffsinger y col., 2015).

En oposición a la baja detección clínica de animales con ERB en nuestro estudio, el alto porcentaje de seroconversión obtenido para los diferentes agentes virales permite inferir la ocurrencia de ERB en forma subclínica. Estos resultados concuerdan con otros autores donde animales clínicamente sanos presentaron indicios de ERB mediante la citología del BAL (Allen y col., 1992), o en estudios en frigorífico, donde se observaron lesiones pulmonares en el 60,6% de los animales que nunca fueron tratados por ERB, asignándole a estas lesiones un rol subclínico (Schneider y col., 2009).

#### **4.3 Momento de presentación de ERB**

En el presente estudio los casos clínicos observados de ERB se presentaron dentro de los primeros 23 días de encierro y particularmente, el 83,3% (5/6) ocurrió dentro de los primeros 15 días. En un estudio reciente, que involucró 13.315 animales con ERB se informó que el 95,8% de los casos se produjo en los primeros 30 días; mientras que el 69,3% de estos se detectaron durante los primeros 15 días (Lopes Baptista y col., 2017). Es de destacar que, en distintos países, al momento de investigar tanto la morbilidad como aspectos terapéuticos y de control de la ERB, se le ha prestado especial atención a los primeros 30-45 días de estadía en el EC (Martin y col., 1989; Radostits y col., 2007; Fazzio y Landoni., 2009; Edwards, 2010; Babcock y col., 2010; Babcock y col., 2013; Amrine y col., 2019). Sin embargo, en

EE.UU. se ha indicado que el promedio al primer tratamiento es el día 40 de llegado al EC y que el 75% de los casos de ERB se dan durante los primeros 50 días (Schneider y col., 2009). Estas diferencias hacen que sea difícil extrapolar la información de otros países relacionada con la dinámica de infección y las estrategias de prevención de ERB, siendo entonces importante contar con datos locales.

#### **4.4 Serología de los virus involucrados en ERB**

##### **4.4.1 Serología BRSV**

###### Seroprevalencia

En nuestro país existen escasas referencias de seroprevalencia para BRSV. Por un lado, Odeón y col. 2001 observaron prevalencias del 23,6% y 30,2% para animales entre 6 y 12 meses provenientes principalmente de rodeos de cría. Por otro lado, en un reciente estudio serológico transversal en EC se informó una seroprevalencia del 78,64% (Ferella y col., 2018). En el presente estudio las seroprevalencias alcanzadas en los LONG 2014, 2015 y 2016 fueron del 100%, 100% y 97%, respectivamente. En estudios realizados en EC en Canadá la prevalencia observada fue entre el 86 al 95% (Durham y Hassard., 1990; Collins y col., 1988), valores que son muy próximos a los obtenidos en el presente estudio. Las altas prevalencias encontradas se podrían explicar por la alta densidad de población en el EC, ya que la densidad y la infección por BRSV se correlacionan positivamente (Sarmiento-Silva., 2012).

###### Dinámica de anticuerpos

La prevalencia de Ac mostró un marcado ascenso entre el inicio (T0) y el T30 en los tres años de estudio, evidenciando diferencias significativas entre los mismos.

En Canadá, en ensayos en EC, se hallaron dinámicas de Ac similares caracterizadas por un marcado aumento entre el momento del ingreso y a los 28 días de estadía (Martin y col., 1989, Allen y col., 1992, Martin y col., 1999).

#### Seroconversión

La seroconversión a BRSV fue alta en todos los ensayos (51% al 80%) lo que concuerda en gran parte, con los resultados obtenidos en diferentes estudios en EC, que muestran valores del 60%, 71,3% y 77,9% en estudios llevados a cabo durante el primer mes de estadía (Martin y Bohac.,1986; Collins y col., 1988; Fulton y col., 2000). En nuestro caso, el estudio comprendió un período de evaluación de 60 días y la seroconversión del período T0-T30 resultó elevada además de significativamente más alta que para los otros dos períodos evaluados (T30-T60 y T0-T60), en concordancia con Sacco y col., 2014.

#### Títulos de Ac al ingreso y seroconversión

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) en el número de animales que seroconvirtieron, según presentaron títulos de Ac anti BRSV bajos y altos al momento del arribo al EC (T0). En este sentido, al evaluar el título de Ac y la seroconversión en su conjunto, se observó que un 90,4% (113/125) de los animales presentaron títulos bajos para BRSV y que todos los animales que seroconvirtieron ( $n=74$ ), del total de animales evaluados ( $n=125$ ), se encontraban en esta situación. Este resultado indica que existe una mayor posibilidad de infección activa en animales con títulos bajos al ingreso respecto de aquellos que presentan un alto título. Por su parte el gran porcentaje de animales con bajos títulos de Ac al ingreso (90,4%) debería ser tenido en cuenta, ya que de manera opuesta animales con

alto título de Ac al ingreso se asocia con menor riesgo de padecer ERB y mayor ganancia diaria de peso -GDP- (Martin y col., 1999). Sobre esta base, poseer títulos de Ac altos contra BRSV resulta una característica deseable al ingreso del EC que reduce el riesgo de infección por este virus.

#### **4.4.2 Serología BVDV**

La interpretación de los resultados serológicos para BVDV resulta un desafío, debido a la posibilidad de que se presenten Ac contra los genotipos BVDV 1 y 2 - antigenicidad cruzada- (Fulton y col., 2000). Además, la variabilidad antigénica dentro del subgenotipo 1b hace muy compleja también, la interpretación de los resultados por SN cruzada. En este sentido, un gran porcentaje de cepas aisladas clasificadas por genotipificación como BVDV 1b presentan reactividad parcial contra cepas de BVDV 1a. Un estudio realizado por Pecora y col. (2014) sugiere que la variante circulante presentaría un coeficiente de antigenicidad cruzada (coeficiente R) mayor a 25, con respecto a la cepa de referencia BVDV 1a.

#### **Seroprevalencia**

Los valores máximos obtenidos para BVDV 1a fueron 87%, 100% y 94% en los LONG 2014, 2015 y 2016 respectivamente. En nuestro país no existen datos para este subgenotipo en explotaciones de EC. Sin embargo, para la misma categoría animal, en sistemas de producción extensivo en la provincia de Buenos Aires se observó una prevalencia del 41,9% (Odeón y col., 2001). En EC el rango de prevalencia para este virus, en otras partes del mundo, es extremadamente variable, con valores entre 10% y 89,7% (Martin y Bohac., 1986; Martin y col., 1989; Fulton y

col., 2000; Moore y col., 2015). Este último porcentaje mencionado se aproxima a los obtenidos en los tres estudios LONG.

Para el caso de BVDV 1b, no se cuenta con datos de serología en EC en nuestro medio. Las altas prevalencias encontradas en el presente trabajo: 73%, 100% y 89% para los años 2014, 2015 y 2016 respectivamente, contrastan con un único trabajo que reporta un 43,8% para rodeos de cría del sur de Argentina (Pérez Aguirreburualde, 2014). En otras partes del mundo, se le está prestando especial atención a este subgenotipo, ya que es el predominantemente involucrado en pulmones de animales muertos por ERB y de aquellos que padecen ERB clínica (Fulton y col., 2002). Por esta razón, recientemente se ha incluido a este subgenotipo en las vacunas comerciales para la prevención de la enfermedad (Pyramid® y Presponse® - Boehringer Ingelheim; Surround 4® -BioCor Animal Health Inc), dado que, hasta el 2002, solo se contaba con una sola vacuna licenciada que lo incluía en EE. UU. (Fulton y col., 2002).

Los resultados de seroprevalencia para BVDV 2, fueron de 57%, 97% y 92% en los años 2014, 2015 y 2016, respectivamente. Al igual que lo mencionado para el subgenotipo 1b, no hay estudios serológicos para este genotipo en EC. En nuestro país solo existe el reporte de una prevalencia del 57,8% en rodeos de cría (Pérez Aguirreburualde, 2014). En un trabajo de revisión, de 9 estudios seroepidemiológicos para BVDV en EC realizados en EE.UU. y Canadá, solo en 2 de ellos incluyeron al genotipo 2 obteniéndose valores de seroprevalencia al ingreso entre 13,3% y el 20% (Campbell, 2004). Nuestros resultados al T0, fueron similares a los expuestos anteriormente en uno de los LONG (17%, LONG 2015), mientras que en los

restantes las seroprevalencias fueron mayores (40% LONG 2014 y 60% LONG 2016).

#### Dinámica de anticuerpos

Para todos los genotipos de BVDV estudiados en los tres ensayos se observó aumento de los títulos de Ac durante los primeros 60 días de estadía en el EC, principalmente entre los tiempos T0 y T30. Sin embargo, también existió aumento de Ac en el período T0-T60. La excepción solo fue para el subgenotipo 1b en el LONG 2016 que no presentó variaciones a lo largo del ensayo. La dinámica de Ac para BVDV 1a resultó concordante con varios estudios que demostraron aumentos en los títulos, pero que se centraron solamente en evaluar el primer mes de estadía en el EC (Martin y col., 1999; Martin y Bohac, 1986; Booker y col., 1999; Fulton y col., 2000). Sin embargo, en el LONG 2014 el ascenso de Ac se observó entre T30-T60, resultado similar a un estudio reciente en el que se encontraron aumentos del título de Ac más allá del día 56 (Wagner, 2018).

#### Seroconversión

Los valores de seroconversión para BVDV 1a fueron variables entre ensayos, con valores de 43%, 73% y 40% para los años 2014, 2015 y 2016, respectivamente. Esto se corresponde con lo descrito por Taylor y col., (1995) quienes utilizaron la misma técnica serológica (SN) con la misma cepa de BVDV 1a (Singer) y hallaron seroconversiones variables entre 0% y 100% en los 11 corrales analizados.

Diferencias de seroconversión entre ensayos se hicieron bien visibles al comparar el LONG 2015 con los otros 2 experimentos y fueron indicativas de la diferente magnitud de infecciones virales activas entre ensayos. Al analizar el período

de estudio, los ensayos que abarcaron mayor cantidad de días (Taylor, 1995) obtuvieron índices de seroconversión similares a los aquí observados; mientras que, en estudios que abarcaron un período menor (35 días), la seroconversión fue menor (Martin y col., 1999).

La seroconversión para BVDV 1b varió entre 6%, 17% y 60% y, a nuestro conocimiento, no hay trabajos que hayan mostrado resultados de seroconversión en terneros de EC. Estos datos deberían ser tenidos en cuenta ya que un estudio realizado en EE.UU. propuso a este subgenotipo como el predominante en terneros con ERB (Fulton y col., 2002), además de haber sido asociado a altas morbilidades y mortalidades en EC (Hessman y col., 2012).

La seroconversión a BVDV 2 fue variable entre ensayos, siendo del 7%, 67% y 43% para los años 2014, 2015 y 2016, respectivamente. Si bien se han descrito valores de 21,9% y 27,9% en EC (Fulton y col., 2000; Fulton y col., 2002) la evaluación, en esos casos, solo se realizó durante los 30-35 días de iniciado el engorde. El haber incluido en nuestro estudio un período mayor (60 días) podría explicar, al menos en parte, las mayores seroconversiones obtenidas.

El análisis de las infecciones virales activas (seroconversiones) de los tres genotipos reveló una distribución similar por períodos. Para los genotipos BVDV 1a y BVDV 2, las diferencias significativas observadas en la frecuencia de seroconversión entre los períodos T0-T30 y T0-T60 indican que las infecciones virales activas fueron más frecuentes en el primer período. A pesar de ello no existieron diferencias al comparar el evento -seroconversión- entre el primer y segundo mes de estadía. En todos los genotipos y subgenotipos se observó una

tendencia a que la seroconversión ocurra mayormente en el primer mes, indicio que la circulación es más marcada en este período, que además coincide con el momento en que la ERB se presenta más frecuentemente.

El período T30-T60 presentó seroconversiones del 19,6% (BVDV 1a), 3,2% (BVDV 1b) y 9,6% (BVDV 2), indicativas de infección viral activa que no han sido tenidas en cuenta en la mayoría de los estudios en EC, en los que se evaluaron los primeros 28-35 días de encierre (Campbell, 2004).

#### Títulos de anticuerpos al ingreso y seroconversión

De un total de 125 animales incluidos en los tres ensayos, 103 (82,3%), 116 (92,8%), y 98 (78,4%) tuvieron títulos bajos al ingreso para BVDV 1a, BVDV 1b y BVDV 2 respectivamente.

Para el caso de BVDV 1a esta frecuencia es similar a lo observado por otros autores quienes informan porcentajes entre 99% y 100% con títulos bajos al ingreso (Martin y Bohac, 1986 y Martin y col., 1989). Estos resultados alertan sobre el riesgo de la población de presentar pérdidas clínicas y subclínicas ya que Martin y col., (1999) demostraron que animales con títulos altos de Ac a BVDV 1a al ingreso presentan menor riesgo de sufrir ERB clínica y mayor GDP. Nuestros resultados muestran asociación altamente significativa entre el ingreso con títulos bajos para BVDV 1a y BVDV 2 y la mayor posibilidad de seroconversión (infección viral activa) en los 60 días de estudio. En este sentido, la mayoría de los animales que seroconvirtieron para BVDV, independientemente del genotipo, presentaron título bajo de Ac al ingreso. En el caso particular de BVDV 1a nuestras observaciones fueron muy similares a las de investigadores canadienses, quienes encontraron que el



100% de los animales seroconvertidos presentaron títulos de Ac  $\leq 32$  al momento del ingreso en el EC (Martin y Bohac., 1986).

#### **4.4.3 Serología BPIV-3**

##### Seroprevalencia

Existe acuerdo mundial que la infección por BPIV-3 es endémica. En nuestro estudio el porcentaje de animales seropositivos fue de 100%, 93% y 100% para los años 2014, 2015 y 2016, respectivamente. En un trabajo que incluyó el análisis de cuatro establecimientos de EC se observaron resultados similares, con un 80,5% y 100% de seroprevalencia para este virus (Durham y Hassard, 1990). En otro estudio, en rodeos de cría y tambo con problemas clínicos de ERB, también se observó una alta prevalencia (80%) para el virus (Härtel y col., 2004). En el mismo sentido, en una investigación realizada en rodeos de cría de México, el porcentaje de animales seropositivos a BPIV-3 fue del 85,6% (Solis-Calderón y col., 2007). Es de destacar que el manejo de estos animales tuvo la particularidad de hacerlos pastar durante la noche y de mantenerlos encerrados durante el día para evitar el calor en la estación de lluvias, condición que el autor consideró como factor de riesgo para el incremento de la prevalencia de las infecciones.

##### Dinámica de anticuerpos

En estudios serológicos longitudinales previos se observó un aumento en los títulos de Ac contra BPIV-3 a lo largo del período evaluado (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989, 1999; Allen y col., 1992). Sin embargo, no se analizó si estas diferencias entre tiempos fueron significativas. En nuestros estudios solo en uno de los ensayos (LONG 2016) se presentó un aumento significativo de los títulos de Ac

en el primer mes de estadía (T0-T30) y se constituyó, en concordancia con los resultados de seroconversión, en el ensayo con mayor circulación de BPIV-3. Al momento de evaluar la dinámica de Ac en el segundo período estudiado (T30-T60), en el LONG 2014 se observó un descenso significativo de Ac, lo que podría indicar que la infección ocurrió previamente al ingreso al EC. Lamentablemente, no hay trabajos que permitan comparar este hallazgo con otros ensayos ya que, en todos ellos, el seguimiento se realizó hasta los 30-33 días de ingresados al EC.

#### Seroconversión

Los resultados de seroconversión encontrados en nuestro estudio (10% a 51%) fueron más bajos que los observados en estudios realizados en Canadá y EE.UU., que informan valores de entre el 60% al 69,5% (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989; Martin y col., 1990; Fulton y col., 2000). Esto indicaría diferencias de circulación de BPIV-3 entre los EC de los distintos países, que podrían estar dadas tanto por las distintas edades (categorías más jóvenes) como por el menor número de animales en EC en Argentina.

La seroconversión se presentó de igual manera en los tres períodos (T0-T30, T30-T60 y T0-T60) por lo que se infiere que las infecciones ocurrieron sin predilección temporal. Como se mencionó en relación con la dinámica de Ac, los estudios realizados para este virus en particular evalúan solo el primer mes de estadía y podrían haber subestimado las infecciones por BPIV-3 durante el segundo mes de engorde (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989; Martin y col., 1990; Fulton y col., 2000).

### Títulos de anticuerpos al ingreso y seroconversión

En el presente estudio, al momento del ingreso, el porcentaje de animales con título bajo de Ac fue del 48%. Nuestros resultados mostraron asociación entre el título al ingreso (alto/bajo) y la ocurrencia de seroconversión lo que indica que animales con título bajo al ingreso presentan más probabilidades de tener una infección viral activa. En este mismo sentido, resultó evidente un mayor porcentaje de seroconversión cuando mayor fue el número de animales seronegativos en el T0 (Fulton y col., 2000). Nuestras observaciones concuerdan con Martin y Bohac (1986) que indicaron que entre el 50% y 70% de la población fue seronegativa al ingreso.

En relación a los niveles de Ac anti BPIV-3 al ingreso resulta difícil interpretar su posible incidencia en el desarrollo de ERB clínica y/o *performance* productiva. Por un lado bajos niveles de Ac afectan negativamente la *performance* productiva y altos niveles reducen el riesgo de ERB, la tasa de morbilidad y la frecuencia de tratamientos (Fulton y col., 2002; 2011). Contrariamente, Martin y col., 1999, indicaron falta de asociación entre el título al ingreso y el riesgo de padecer ERB.

Nuestros resultados mostraron asociación entre el título al ingreso (alto/bajo) y la ocurrencia de seroconversión, indicando que los animales con título bajo al ingreso presentan más probabilidades de tener una infección viral activa. Esto se pone de manifiesto al comparar nuestro estudio con lo publicado por Fulton y col. (2000) quienes tuvieron mayor seroconversión (68,3%) acompañada de mayor proporción de animales seronegativos al día 0 (71,7%). Martin y Bohac, 1986 estudiaron las seroconversiones para BPIV-3 y mostraron que 108/109 animales seroconvertidos

tuvieron títulos bajos al ingreso ( $\leq$  a 360 UIHA). Sin embargo, este estudio no realizó un análisis estadístico de estas variables.

#### **4.4.4 Serología BoHV1**

##### Seroprevalencia

A pesar de ser uno de los virus más estudiados en nuestro país, se dispone de poca información acerca de la prevalencia de BoHV1 en establecimientos de EC. En el presente ensayo la prevalencia más alta observada fue de 13%, 26% y 50%, para los años 2014, 2016 y 2015, respectivamente. Para animales de la misma categoría y edad (6-12 meses) se han informado seroprevalencias variables entre 8,8% y 24,8% en rodeos de cría (Odeón y col., 2001), siendo los establecimientos con manejo más intensivo y con mayor movimiento de animales los que evidenciaron las seroprevalencias más altas. De igual manera, la seroprevalencia en sistemas de tambo con alta intensificación alcanzó el 38,5%, resultado más similar a los obtenidos en este trabajo (Goswami y col., 2017). Estos datos respaldan la hipótesis que a mayor movimiento y concentración de animales, tal como sucede en el EC, se alcanzan seroprevalencias más altas.

Adicionalmente, la variabilidad en los resultados de seroprevalencia obtenidos puede haber estado dada por el origen de los animales. Un metaanálisis realizado a partir de 44 trabajos publicados encontró diferencias significativas en la seroprevalencia de BoHV1, cuando se tuvo en cuenta la región de donde provinieron los animales, con un rango del 5 al 88% en China (Chen y col., 2018).

Sobre la base de estas dos consideraciones presentadas, los valores de seroprevalencia más altos encontrados en nuestro trabajo, respecto de otros realizados

en el país, pudieron haber sido el resultado no solo de la mayor densidad animal en EC sino de la particularidad de haber incluido animales provenientes de diferentes orígenes, incluyendo distintas provincias.

#### Dinámica de anticuerpos

La dinámica de Ac contra BoHV1 fue diferente entre los ensayos. En el LONG 2015 se observó un aumento significativo de los títulos de Ac en cada uno de los tiempos estudiados. Sin embargo, en los LONG 2014 y 2016 no hubo diferencias entre los distintos tiempos de estudio. A partir de esto se desprende que si bien ocurrió la exposición al agente en los tres experimentos solo fue importante la circulación en el LONG 2015. Estudios previos, realizados en EC, indicaron ascenso en los títulos de Ac durante el primer mes en el establecimiento (Martin y col., 1989; Booker y col., 1999; Martin y col., 1999). Sin embargo, otros trabajos no informan variación de Ac dentro del primer mes, ni durante 56 días de estudios (Martin y Bohac, 1986, Wagner, 2018). Estas diferencias en los resultados encontrados, en los distintos años, son difíciles de explicar y posiblemente no respondan a un solo factor.

#### Seroconversión

El porcentaje de seroconversión fue diferente en los estudios LONG realizados. En dos de ellos (LONG 2014 y 2016) la circulación fue baja a moderada (7% y 15%) mientras que en el LONG 2015 el porcentaje de seroconversión fue más alto (60%). Porcentajes de seroconversión bajos, similares a los encontrados en los LONG 2014 y 2016, han sido informados en diversos trabajos realizados en EC durante el primer mes de estadía (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989; Martin y col., 1990; Martin y col., 1999; Allen y col., 1992). Esta mínima evidencia

serológica hizo que los distintos autores desestimaran la participación de BoHV1 en cuadros clínicos y/o subclínicos de ERB. Sin embargo, en el LONG 2015 la seroconversión fue mayor (50%) y resulta difícil encontrar un factor que explique este alto porcentaje.

Al analizar el momento en el que tuvieron lugar las seroconversiones, se observó que se produjeron con igual frecuencia durante los diferentes períodos de engorde evaluados. De esto se desprende que estudios serológicos longitudinales en EC podrían haber subestimado estas infecciones que por serología no pueden ser identificadas durante el primer mes de estadía (Martin y Bohac, 1986; Martin y col., 1989; Martin y col., 1990; Martin y col., 1999; Allen y col., 1992).

#### Títulos de anticuerpos al ingreso y seroconversión

De los 125 animales totales estudiados, 121 (96,8%) presentaron título bajo de Ac para BoHV1 al T0. No existen estudios en EC que hayan informado el número de animales con este mismo criterio de título alto o bajo al T0. Otros autores, en cambio, han informado porcentaje de animales seronegativos al arribo con valores de entre 78,5% y 96,1% (Durham y Hassarld 1990, Martin y col., 1990). Poseer altos títulos de Ac al ingreso, es una condición deseable que ha sido asociada a menor riesgo de padecer ERB, menor morbilidad y menor frecuencia de tratamiento (Chamorro y col., 2014). En contraposición, se ha informado también que animales con mayores títulos de Ac al T0 presentaron mayor riesgo (*odds ratio*=1,3) de mortalidad (Booker y col., 1999). Esto último es de esperar para el caso particular de BoHV1, ya que animales seropositivos en el T0 son los que tienen posibilidades de sufrir la reactivación del virus en estado de latencia y dar lugar al posterior desarrollo de enfermedad. En

nuestros estudios solo un animal (animal 3) del LONG 2016 presentó seroconversión con una dinámica de Ac que fue considerada como indicativa de la reactivación del virus en latencia. El título de este animal fue de 1/40 en los tiempos T0 y T30 y; de 1/640 en el T60.

Todos los animales que seroconvirtieron presentaron título bajo anti BoHV1 al T0. A pesar de ello no existió diferencia entre la oportunidad de seroconvertir y el título al ingreso. En contraposición, otro autor halló correlación entre el título al inicio y el cambio de título (Martin y col., 1989). Cabe remarcar que si bien el diseño del estudio realizado por el mencionado autor fue también longitudinal, la experiencia tuvo lugar considerando solo los primeros 28 días de engorde.

#### **4.4.5 Infecciones virales múltiples detectadas mediante serología**

Independientemente del virus, la posibilidad de presentar una infección viral activa (seroconversión) durante los primeros 60 días de engorde, fue muy alta. En el LONG 2014 fue del 97%, en el LONG 2015 del 93% y en el LONG 2016 del 94%.

Gran parte de los animales que seroconvirtieron lo hicieron a más de un virus lo cual se interpretó como coinfecciones virales. Del total de la población evaluada, los porcentajes de seroconversiones múltiples fueron 73%, 90% y 67% para los LONG 2014, 2015 y 2016 respectivamente. Estos resultados son difíciles de comparar con otros estudios, ya que no se evaluaron en todos los casos los mismos virus y/o subgenotipos de los BVDV (particularmente BVDV 1b) lo que pudo haber incrementado la chance de presentar seroconversiones múltiples.

En un estudio de 145 brotes clínicos de ERB el evento seroconversión múltiple fue del 27,2% del total de animales (Graham y col., 1998). Sin embargo, este estudio no detalla el tipo de sistema productivo en que se encontraban los animales involucrados en el experimento, lo que hace difícil establecer comparaciones con nuestro estudio.

En rodeos de cría y tambo seroconversiones múltiples han sido informadas con tasas del 16% y 36% respectivamente en animales de similar categoría (Hägglund y col., 2006; Streitenberger y col., 2017). Al comparar estos resultados con lo obtenido en EC podemos concluir que las coinfecciones son más importantes en este último sistema con un posible rol de sinergismo en la interacción entre los agentes virales estudiados.

#### **4.5 Detección de los virus involucrados en ERB**

##### **4.5.1 BRSV: aislamiento viral y RT-nPCR a partir de sobrenadante de cultivo**

En el presente estudio, no se observó ECP compatible con BRSV a partir de los hisopados nasales ni se logró detectar el virus a partir del sobrenadante de cultivo. La dificultad para la detección por AV ha sido reportada por otros autores (Ferella y col., 2018). En este sentido se mencionan factores relacionados al ciclo del virus en el animal y a limitaciones que presenta la propia técnica. Con respecto al ciclo del virus, éste presenta un corto tiempo de eliminación en el animal (5-6 días) lo que disminuye la posibilidad de detectarlo en ensayos de campo y obliga a aumentar la frecuencia de muestreos. En infecciones experimentales la eliminación del virus se observó entre los 2 y 8 días post infección (West y col., 1998; Grissett y col., 2015; Philippe-



Reversat y col., 2017). Debe tenerse en cuenta que se trata de un virus muy lábil y presenta bajo número de receptores para adsorción viral en líneas celulares (Arns y col., 2003; Sarmiento-Silva y col., 2012). En este mismo sentido, en un trabajo realizado en Brasil, se requirieron 9 pasajes en células MDBK para lograr el AV.

Por otro lado, también resultaron negativos los estudios en sobrenadantes de *pool* de muestras, a pesar de utilizar técnicas más sensibles (RT-nPCR) y con capacidad de detectar al BRSV por tiempo más prolongado (12-13 días) (Valarcher y col., 1999); lo que pone de manifiesto lo dificultoso del proceso. Otra posibilidad a la falta de detección es que otros virus distintos presentes en las muestras clínicas desarrollen más fácilmente, compitan en la monocapa de células y dificulten la replicación de BRSV.

#### **4.5.2 BRSV: RT-nPCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos**

El porcentaje de detección de BRSV por RT-nPCR a partir de los animales seroconvertidos fue entre el 6% y el 21%. Dicho porcentaje resultó inferior al observado por Klem y col., 2014 quienes informan un 49% de detección. Estas diferencias podrían explicarse, por un lado, por el criterio de inclusión usado en el mencionado trabajo, donde solo se seleccionaron rodeos en los cuales se estuviese desarrollando un brote de ERB con gran cantidad de animales afectados clínicamente. Por otro lado, aquel trabajo utilizó la técnica de RTqPCR que es considerada de mayor sensibilidad que la RT-nPCR utilizada en nuestro estudio (Maclachlan y Dubovi, 2011). En contraposición, al analizar hisopos nasales de bovinos asintomáticos en frigorífico el porcentaje de detección fue muy bajo, cercano al 1%

(Domingues y col., 2011), lo que indicaría una mayor circulación e importancia en animales más jóvenes como los estudiados en esta tesis.

Los hisopados nasales de animales seroconvertidos permitieron identificar de manera directa el genoma de BRSV en los tres estudios LONG, lo que fue interpretado como evidencia de circulación de este agente viral. Este hallazgo, a nuestro conocimiento, es la primera detección por RT-nPCR del virus BRSV en sistemas de EC en Argentina.

Del total de animales positivos por RT-nPCR sólo dos animales del LONG 2016 presentaron ERB clínica, lo que indica que las infecciones para BRSV cursaron de manera subclínica. Este hecho tiene dos implicancias importantes, por un lado puede que estos animales hayan tenido mermas en su performance productiva (Sarmiento-Silva y col., 2012) y, por otro, podrían ser los encargados de mantener el virus en el rodeo (Domingues y col., 2011).

#### **4.5.3 BVDV: aislamiento viral y RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo**

Los resultados presentados en este estudio confirman de manera directa la circulación de BVDV en los LONG 2014 y 2016 ya que en ambos se logró detección a partir de los sobrenadantes de cultivo de los hisopos nasales.

En uno de los estudios (LONG 2014), dos animales presentaron un claro ECP compatible con BVDV y cada uno formó parte de dos *pools* positivos por RT-PCR en el T30 a partir del sobrenadante de cultivo del 5<sup>to</sup> pasaje, interpretándose que se trataron de infecciones agudas. Durante el LONG 2016 un *pool* de cada tiempo (T0, T30 y T60) resultó positivo. Es probable entonces que estos tres *pools* hayan sido

positivos porque en ellos quedó incluido un animal PI para BVDV, aunque de todos modos no puede descartarse la posibilidad de que hayan quedado incluidas en estos, muestras provenientes de animales con infección aguda.

De un total de  $n=47$  *pools*, 42 resultaron negativos por RT-PCR a partir del sobrenadante de cultivo. Sin embargo, evaluando la seroconversión se obtuvieron evidencias de altos índices de circulación viral. Esto era de esperar ya que solo uno de los animales en todos los ensayos fue un animal PI, con lo cual la mayoría de las infecciones fueron agudas. En este último tipo de infección los animales excretan una relativa baja cantidad de virus y por un período corto (7-10 días), situación contraria a lo que ocurre con los PI (Philippe-reversat y col., 2017; OIE 3.4.7., 2018) lo que explica la discordancia entre seroconversiones y detecciones por técnicas moleculares. Estos resultados son comparables parcialmente con un estudio prospectivo en el que solo cuatro de 205 terneros post destete fueron positivos por aislamiento viral a partir de hisopados nasales. Destacando además que solo uno de los cuatro animales en aquel estudio fue PI (Fulton y col., 2002).

#### **4.5.4 BVDV: RT-PCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos**

A diferencia de lo presentado en el apartado anterior, la realización de RT-PCR a partir de hisopados nasales directamente, permitió identificar a BVDV en todos los LONG. La discordancia entre estos dos métodos seguramente se debió a que para las técnicas moleculares no son necesarias las partículas virales activas. Por otro lado, los estudios moleculares poseen mayor sensibilidad. Además, y como fue mencionado para BRSV, la posibilidad de competencia por parte de otros virus en la

muestra pudo haber tenido influencia negativa para la posibilidad de aislamiento de BVDV.

El porcentaje de animales seroconvertidos positivos por RT-PCR rondó entre el 5 y 14% lo que es similar al 13% de prevalencia en bovinos de carne obtenida por RT-nPCR a partir de suero en China (Deng y col., 2015). Moore y col. (2015) trabajaron con una categoría de animales similar a la de este ensayo y en su caso se observó una variación entre 0% y 12% en hisopos nasales de 9 cohortes evaluadas. En un estudio de secuenciación metagenómica en EC de EE.UU. los valores de prevalencia en hisopados nasales fueron del 5% y 25% en animales asintomáticos y sintomáticos respectivamente. En relación con esta última fuente nuestros valores de morbilidad de ERB (0%-6,6%) pueden haber sido la causa de menor prevalencia de BVDV por RT-PCR. Todo esto en su conjunto, indicaría una prevalencia de circulación similar en Argentina respecto de Australia, China y EE.UU. Sin embargo, debería tenerse en consideración que en nuestros estudios sólo fueron analizados animales seroconvertidos para BVDV.

#### **4.5.5 BVDV: genotipificación de BVDV**

Los cinco animales, en los que se realizó secuenciación y genotipificación pertenecieron al subgenotipo BVDV 1b, lo que tiene implicancias directas en las estrategias de diagnóstico y vacunación de la enfermedad. Esto se debe a que existen diferencias antigénicas entre BVDV 1a y BVDV 1b (Fulton y col., 2003) que dificultan la detección de Ac contra algunas cepas de BVDV 1b cuando se utiliza una cepa de BVDV 1a. En el mismo sentido, varios autores mencionan la falta de protección cruzada para infecciones con BVDV 1b cuando se utilizan como

inmunógenos solo cepas BVDV 1a (Fulton, y col., 2002; Pecora y col., 2014; Fulton y col., 2009). Por esta razón es que en EE.UU. ya existen 3 vacunas que han incorporado al genotipo BVDV 1b en su formulación (Pyramid® y Presponse® - Boehringer Ingelheim; Surround 4® -BioCor Animal Health Inc.).

El genotipo BVDV 1b ha sido el más frecuentemente implicado en infecciones en EC ya sea a partir de monitoreos de animales PI así como de enfermos clínicos y muestras de necropsias (Hessman y col., 2012; Larson, 2015; Ridpath y col., 2010). Particularmente en infecciones respiratorias agudas éste ha sido considerado el genotipo predominante (Fulton, y col., 2002).

Estudios filogenéticos nacionales e internacionales indican un pronunciado decrecimiento en la circulación de cepas BVDV 1a y presentan al subgenotipo BVDV 1b como reemergente y más frecuentemente aislado (Ridpath y col., 2011; Pecora y col., 2014). Estos resultados preliminares marcan un interesante punto de partida para la futura genotipificación de cepas de BVDV en bovinos de EC, ya que esta información ayudará a mejorar las estrategias de inmunoprofilaxis y diagnóstico del virus.

#### **4.5.6 Animales persistentemente infectados para BVDV**

Un animal perteneciente al LONG 2016 de un total de siete animales seronegativos para BVDV en T0, T30 y T60 presentó detección de BVDV a partir de todas las muestras de suero e hisopos nasales, lo cual se interpretó como un animal PI. Estos animales, en el EC, tienen un rol epidemiológico central ya que son la mayor fuente de infección para animales susceptibles, dado que eliminan virus

durante toda su vida en todas sus secreciones, especialmente las nasales (Fulton y col., 2005; Quintero Barbosa y col., 2019). En este sentido, los animales PI son una fuente de infección no solo para los cohabitantes del corral sino también para los corrales contiguos (Larson, 2015), ya que son capaces de infectar al 70-100% de la población susceptible del corral (Moore y col., 2015).

Las repercusiones clínicas se hicieron patentes en presencia de un PI, ya que en el estudio LONG 2016 uno de los animales con ERB clínica seroconvirtió para el mismo genotipo del PI (BVDV 1b) y fue positivo por RT-PCR en el hisopado nasal al momento de detección clínica.

En un trabajo realizado en Australia se menciona que el riesgo de padecer ERB es 43% mayor cuando hay exposición a un PI (Moore y col., 2015). Sobre esta base es que algunos autores sostienen que la detección y eliminación de PI es una estrategia importante para minimizar la pérdidas ocasionadas por BVDV en EC (Grooms y col., 2014).

En nuestros estudios, el porcentaje de detección de PI fue del 0% (LONG 2014 y LONG 2015) al 1,53% (LONG 2016). Consideramos que la falta de detección de PI en los LONG 2014 y 2015 pudo estar dada por la poca cantidad de animales testeados (n=30) ya que la prevalencia de PI en EC ha sido mencionada entre el 0,2-0,4% (Grooms y col., 2014; Larson, 2015; Fulton y col., 2006), valores que son inferiores a los presentados por otros autores (0,5-4%; 1-2%) donde se informaron todos los sistemas de producción en el mismo grupo (Quintero Barbosa y col., 2019; OIE 3.4.7., 2018).

#### **4.5.7 BPIV-3: aislamiento viral y RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo**

El aislamiento del BPIV-3 en todos los LONG y en cada uno de los tiempos en estudio es, a nuestro conocimiento, la primera detección del virus en EC en Argentina. Además es evidencia específica que el agente se encuentra circulando recientemente (Fulton y Confer, 2012).

La alta frecuencia de detección, si bien puede hacer pensar en una mayor circulación de BPIV-3 con respecto a los otros virus estudiados, no necesariamente sea tan así, ya que es un virus que crece muy fácilmente en células MDBK, razón por la cual puede haberse favorecido su amplificación y posterior detección por sobre los demás virus (Ellis, 2010; Maclachlan y Dubovi, 2011).

#### **4.5.8 BPIV-3: RT-PCR a partir de hisopos nasales de los animales seroconvertidos**

Todos los animales seroconvertidos para BPIV-3 fueron negativos por RT-PCR. Esto se contrapone con lo presentado por otros autores quienes bajo condiciones experimentales encontraron concordancia entre la seroconversión viral y la detección por RT-PCR (Dong y col., 2012). En el mismo sentido, un estudio epidemiológico, no logró detectar el virus por RT-PCR en varios rodeos; sin embargo los hallazgos serológicos mostraron indicios de infección (Autio y col., 2007). Este hecho tiene importancia ya que cuando se intenta la detección solo por RT-PCR y se obtienen resultados negativos, puede que el virus se encuentre circulando en el rodeo. Esta situación se observó en un reciente estudio realizado en Brasil en EC en el que se buscó la presencia de BPIV-3 por RT-PCR (Headley y col., 2018). Por este motivo

es que ambas técnicas (estudios serológicos y RT-PCR) deberían ser aplicadas para el monitoreo de las infecciones por BPIV-3 en EC. Consideramos además que la frecuencia de muestreos en nuestros ensayos (cada 15 días) puede haber tenido influencia en la falta de detección por lo que deberían programarse a futuro, ensayos con muestreos más frecuentes.

#### **4.5.9 BoHV1: aislamiento viral y PCR a partir de sobrenadante de cultivo**

Solamente los *pools* de aislamiento del LONG 2016 fueron positivos por RT-PCR a partir del sobrenadante de cultivo, permitiendo detectar de manera directa la infección de BoHV1 en el LONG 2016 en los T0, T15 y T30.

De manera similar a los resultados LONG 2016, en un trabajo en EC se aisló el virus durante el primer mes de estadía (Fulton y col., 2002). En aquel estudio sobre un total de 205 animales 15 fueron positivos para BoHV1 por AV. Si bien los autores indicaron que los positivos probablemente hayan sufrido infecciones naturales, esto debe ser tomado con precaución ya que todos los animales habían recibido una vacuna viva atenuada para BoHV1 al ingreso al EC y es conocido que esta técnica diagnóstica no diferencia infecciones por exposición natural o vacunal. A diferencia del mencionado trabajo, dado que en nuestro país solo está permitido el uso de vacunas con virus inactivados para BoHV1 (SENASA, Resol. 216/2006; Resol. 351/0607), nuestros hallazgos garantizan que las detecciones fueron cepas de campo de BoHV1 en EC de Argentina.

No se identificó infección por el virus por esta técnica en los LONG 2014 y 2015 a pesar de haber mostrado circulación viral por técnicas serológicas. En este



aspecto, si bien el aislamiento de BoHV1 es relativamente sencillo en células MDBK (Nandi y col., 2009; Maclachlan y Dubovi, 2011) se conoce la importancia del muestreo en los estadios más tempranos de infección (Tomlinson y col., 2017). Sobre esta base, nuestra frecuencia de muestreos (intervalo de 15 días) podría haber desfavorecido el aislamiento, ya que la eliminación viral en secreciones nasales dura 7-10 días luego de la infección (Jones y Chowdhury, 2007).

#### **4.5.10 BoHV1: PCR a partir de hisopos nasales de animales seroconvertidos**

La falta de detección BoHV1 en los hisopados nasales de los animales seroconvertidos puede que se haya relacionado con la falta de coincidencia de eliminación viral al momento del muestreo ya que esta es breve, irregular y presenta variabilidad individual (Jones y Chowdhury, 2007; O'Neill y col., 2014) como lo mencionado en el apartado anterior (4.5.9) para los LONG 2014 y 2015. Es de destacar además que en el LONG 2014 solo dos animales seroconvirtieron al virus, resultado indicativo de baja circulación del virus en esa población con lo que redujo las posibilidades de identificar positivos.

A diferencia de BRSV que es un virus difícil de aislar, en el caso de BoHV1, la detección por AV de toda la población fue más efectiva que la detección por PCR realizada a partir hisopos nasales de animales seroconvertidos. Estas conclusiones encuentran soporte en lo puntualizado por la OIE quienes para el objetivo de demostrar ausencia de infección en la población ponderan los estudios serológicos por sobre el AV y RTqPCR (OIE 3.4.11, 2018).

#### **4.5.11 Detección viral en animales con ERB clínica**

Todos los animales con ERB clínica presentaron detección por técnicas moleculares de uno o más de los virus estudiados al momento de la detección de enfermedad. Esto es muy significativo ya que la detección en animales con enfermedad clínica permite asociar los agentes con el desarrollo del cuadro clínico-patológico ocurrido (Caswell y col., 2012; Fulton y Confer, 2012).

BPIV-3 fue el virus identificado con mayor frecuencia en los animales clínicos y es ésta la primera comunicación en nuestro país para animales con ERB clínica en EC. El virus estuvo implicado en el desarrollo de ERB clínica en los LONG 2015 y 2016, sin embargo, hubo evidencia serológica de circulación en todos los ensayos, lo que es de esperar con este agente dado que puede cursar tanto de manera asintomática o generar enfermedad respiratoria grave (Fulton y col., 2002; Maidana y col., 2012). Resultados opuestos a los nuestros fueron mencionados en Brasil recientemente, donde BPIV-3 no fue detectado en ningún animal con ERB clínica mediante RTqPCR (Gaeta y col., 2018). Consideramos que los pasajes en células fueron claves para la amplificación y posterior detección del virus en animales con ERB clínica, ya que en nuestro caso la detección solo se pudo lograr en las muestras de BAL e hisopos nasales que fueron amplificadas en pasajes celulares.

En segundo lugar, en relación a la frecuencia de detección, BRSV y BVDV se identificaron con igual magnitud que la documentada en EC de EE. UU. (Mitra y col., 2016).

Respecto a BVDV, adicionalmente, tres animales con ERB clínica seroconvirtieron a alguno de los genotipos de BVDV, pero no pudieron ser detectados por RT-PCR, con lo que se interpretó como infecciones subclínicas. A pesar de ello, hay que tener en cuenta dos conceptos claves en la infección por BVDV. Por un lado, la discrepancia que existe entre la eliminación viral y los signos clínicos causados por BVDV. Estos últimos ocurren durante los 7 a 10 días de comenzada la eliminación viral. Por otro lado, los niveles de virus eliminados por infecciones agudas que son inferiores a los eliminados por los animales PI (OIE 3.4.7., 2018).

La identificación de BRSV, si bien ha sido realizada en muestras clínicas en EC en otros países (Moore y col., 2015; Headley y col., 2018), constituye un hallazgo muy importante para Argentina dado que solo hay una comunicación de circulación viral basada en un estudio serológico en EC (Ferella, y col., 2018). Futuros estudios de casos y controles son necesarios para establecer nuestra situación respecto a BRSV en EC y su ponderación frente a los otros agentes virales involucrados en ERB. Cabe destacar que en una reciente investigación que incluyó hisopados nasales de animales con ERB clínica de EC, tambo y doble propósito (n=133), BRSV fue el virus más frecuentemente detectado (Paller y col., 2017).

En nuestros ensayos, BoHV1 fue el único virus no identificado en animales con ERB clínica, en concordancia con un estudio de un brote en EC donde tampoco fue detectado a partir muestras de hisopados nasofaríngeos (Headley y col., 2018). Si bien uno de los animales enfermos seroconvirtió al virus, la falta de detección no hizo posible la asociación con la enfermedad, restándole importancia respecto a los otros

virus en el desarrollo de ERB clínica. Posiblemente este animal haya cursado la ERB subclínica y, por lo tanto, haya pasado desapercibido (Caldow y col., 2018). La severidad de la enfermedad está relacionada con la virulencia de la cepa de BoHV1, la resistencia del hospedador, la edad y las infecciones bacterianas concurrentes (Muylkens y col., 2007). Por último, cabe remarcar que la serología no es la técnica más aconsejable para confirmar casos clínicos (OIE 3.4.11., 2018).

Las diferentes técnicas de detección viral en animales con ERB clínica tuvieron sus ventajas y desventajas según el virus en cuestión. Por un lado, para el caso de BPIV-3, que es fácilmente aislado en células MDBK (Ellis, 2010), el pasaje por células permitió su identificación, que no había sido lograda cuando se intentó su aislamiento directamente en las muestras de BAL e hisopado nasal. Del lado opuesto, virus más difíciles de aislar (BRSV y BVDV) probablemente se hayan vistos en desventaja al competir por la monocapa con BPIV-3 resultando en una falta de detección luego de los pasajes en MDBK. Afortunadamente, BRSV y BVDV pudieron ser detectados por RT-PCR directamente desde los hisopados nasales y BAL. Estas últimas técnicas tienen, además, la ventaja respecto del AV que solo detectan el genoma del virus, que puede o no estar viable, lo que creemos incrementó las posibilidades de detección. Sobre la base de estos resultados la implementación de la combinación de pasajes en células MDBK y la detección por técnicas moleculares directamente de las muestras clínicas permitiría mejorar la detección de estos agentes virales en animales con ERB clínica en EC.

Finalmente, las coinfecciones halladas (BPIV-3+BVDV y BPIV-3+BRSV) en los animales enfermos sostienen la naturaleza multifactorial de ERB en EC como lo

descrito por Headley y col., 2018 e implica posibilidad de sinergismo entre virus. En los casos en los que en la combinación de virus se encuentra el BVDV este puede tener, además, un rol como agente inmunodepresor potenciando así las infecciones por otros agentes (Graham y col., 1998).

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ Todos los virus estudiados, por diferentes técnicas, fueron detectados en animales en EC.
- ✓ La ERB clínica se observó en los primeros 23 días de encierre.
- ✓ La detección de uno o más de los virus estudiados al momento del inicio del cuadro clínico de ERB permite confirmar la asociación de estos agentes en el desarrollo de la misma.
- ✓ La realización simultánea de técnicas moleculares directamente a partir de hisopados nasales y fluido de BAL, así como a partir de sobrenadante de cultivo de las muestras antes mencionadas, mejoró la capacidad de detección de los agentes virales en animales con ERB clínica.
- ✓ El alto porcentaje de seroconversión obtenido para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 demuestra su gran circulación en EC.
- ✓ La infección viral activa (seroconversión) para BRSV, BVDV 1a, BVDV 2 y BPIV-3 fue significativamente más alta en animales con títulos bajos al ingreso del EC.

- ✓ Los índices de seroconversión para BPIV-3 y BoHV1 fueron similares a lo largo de los primeros 60 días de engorde lo cual sugiere que las infecciones/reactivaciones virales ocurrieron sin predilección temporal.
- ✓ Las infecciones virales múltiples fueron muy frecuentes en EC y sugieren interacción sinérgica entre los virus estudiados.
- ✓ La detección de todos los virus estudiados a partir de hisopados nasales confirmó de manera directa su presencia en las poblaciones durante los primeros 30 días en el EC.
- ✓ La detección de cepas de BVDV 1b lleva a considerar la revisión de las estrategias de diagnóstico y de vacunación.
- ✓ Las pruebas serológicas resultan una mejor herramienta para el diagnóstico poblacional de circulación viral, dada la pobre concordancia observada entre éstas y las pruebas de biología molecular con el esquema de muestreos utilizado.

## **CAPÍTULO 3**

### **Estudio anatomopatológico y virológico en bovinos de engorde a corral con lesiones de enfermedad respiratoria bovina**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

El bovino es una especie con gran susceptibilidad a padecer enfermedades respiratorias (Cooper y Brodersen, 2010). En bovinos de carne, esta predisposición puede haber sido consecuencia de la selección genética que se ha realizado a lo largo del tiempo, en pos de líneas con mayor capacidad digestiva, masa muscular e índice de crecimiento. Junto con estos logros deseables, resultó un animal con mayores requerimientos de oxígeno total llevando a un desbalance entre estos y la capacidad de hematosis pulmonar (Dedonder, 2008).

La capacidad de intercambio gaseoso en bovinos es menor que en otras especies domésticas (Dedonder, 2008) por ciertas características anatómicas y fisiológicas propias de la especie. Los pulmones bovinos poseen una gran segmentación, en virtud de la presencia de septos interlobulillares ricos en tejido conectivo (Cooper y Brodersen, 2010), y una limitada ventilación colateral debida a la escasa cantidad de poros de Kohn que son los que permiten una ruta alternativa de intercambio de aire entre alvéolos (Ackermann y col., 2010). La compartimentación predispone a la hipoxia de las zonas del pulmón distales a los bronquiolos terminales cuando las vías aéreas resultan ocluidas (Cooper y Brodersen, 2010; Caswell y

Williams, 2016), situación muy frecuente en bovinos con lesiones de enfermedad respiratoria bovina (ERB). Por otro lado, los bovinos están más expuestos a la inhalación de patógenos (Cooper y Brodersen, 2010). Fisiológicamente, esto se relaciona con la menor capacidad pulmonar que poseen en relación con otros mamíferos domésticos lo cual hace que el bovino presente mayor respiración basal (Cooper y Brodersen, 2010). La escasa capacidad pulmonar está dada por el gran volumen de espacio muerto pulmonar -árbol traquebronquial largo- (Ackermann y col., 2010), y el limitado volumen pulmonar total (Dedonder, 2008). Todo esto en su conjunto, contrapone en esta especie una menor capacidad de hematosis con una gran ventilación pulmonar basal que conlleva a mayor exposición a patógenos.

Para mitigar el constante desafío de agentes productores de lesión, el aparato respiratorio bovino cuenta con un complejo sistema inmune en el que intervienen varios componentes de la inmunidad innata y adaptativa (Ackermann y col., 2010). Los agentes virales, así como el estrés y las infecciones por micoplasmas, alteran negativamente a estos mecanismos permitiendo la colonización y proliferación de agentes bacterianos secundarios, lo que resulta en el desarrollo de lesiones pulmonares (Leite y col., 2002; Ackermann y col., 2010; Panciera y Confer, 2010; Albayrak y col., 2019).

El término ERB comprende a las neumonías en bovinos causadas por diversos agentes infecciosos y factores ambientales que dan lugar a un complejo abanico de lesiones pulmonares (Murray y col., 2017). Esta enfermedad es la que mayor mortalidad genera en los sistemas de engorde a corral (EC) de nuestra región (Costa y col., 2003; Galván y col., 2019) y del mundo (Babcock y col., 2010; Lopes Baptista y



col., 2017). En EE.UU. se ha consignado que la mortalidad por ERB en EC es del 0,7% (Fulton y col., 2009), mientras que el costo por animal muerto, en un estudio realizado en EC de Brasil, fue de 682 U\$\$, lo que demuestra también su impacto económico negativo (Lopes Baptista y col., 2017).

Una de las herramientas de gran utilidad dentro de los programas de sanidad en EC es la necropsia. Su realización en todos los animales que mueren permite monitorear las enfermedades generadoras de pérdidas económicas, además de brindar la oportunidad de obtener muestras para estudios complementarios (Costa y col., 2003). En el caso de ERB, los hallazgos anatomopatológicos, junto con los resultados de estudios complementarios (histopatología, virología, bacteriología), permiten caracterizar de manera precisa el cuadro clínico-patológico (Caswell y col., 2012).

Si bien las lesiones de ERB son frecuentes, aun no se ha logrado un consenso internacional en relación a la clasificación de las neumonías en esta especie (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008; Fulton y col., 2009; Panciera y Confer, 2010; Murray y col., 2017).

Respecto a los agentes virales involucrados en la ERB destacan: virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus parainfluenza 3 bovino (BPIV-3), alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1) y coronavirus bovino (BCOV). Las lesiones pulmonares macroscópicas no suelen orientar únicamente hacia la participación viral y en general, se observan lesiones compatibles con complicaciones bacterianas y/o por micoplasmas (Caswell y Williams, 2016). En estas circunstancias resulta necesario, para el diagnóstico de los agentes infecciosos, la recolección de muestras para estudios complementarios (Caswell y col., 2012;

Murray y col., 2017). Como excepción, en la infección por BoHV1, el hallazgo de lesiones en tráquea (traqueítis fibrinonecrótica difusa) resulta muy sugestiva de la acción de este virus.

Entre las técnicas disponibles para la detección de agentes virales causales de ERB se encuentran la inmunohistoquímica (IHQ), distintos tipos de técnicas moleculares (PCR) y el aislamiento viral (AV) (Fulton y Confer 2012), siendo las técnicas de PCR y de IHQ las más utilizadas en los laboratorios de diagnóstico (Cooper y Brodersen, 2010). La IHQ presenta la ventaja de poder identificar los antígenos en las células y en los tejidos lesionados (Cooper y Brodersen, 2010). Para los agentes bacterianos y micoplasmas, las técnicas que se usan para su identificación son IHQ, PCR y cultivo microbiológico (Fulton y Confer 2012; Murray y col., 2017).

En Argentina, los agentes virales que se han reportado se detectaron a partir de muestras de casos aislados de ERB en diferentes sistemas productivos (Pidone y col., 1999; Bagnis, 2000; Bagnis y col., 2006; Maidana y col., 2012; Pecora y col., 2014; Ferella y col., 2018). Sin embargo, no se dispone de información en relación con la participación de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en animales que presentan lesiones de ERB en EC.

## **1.1 Objetivos**

- a. Determinar el momento de presentación de las lesiones anatomopatológicas de ERB en establecimientos de EC.

- b. Establecer el diagnóstico anatomopatológico de los cuadros respiratorios, mediante la caracterización y categorización metódica de las lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas.
- c. Evaluar la presencia de antígenos de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en los pulmones que presenten lesiones de ERB mediante la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica.
- d. Identificar los virus involucrados en el complejo ERB en tejido pulmonar mediante técnicas moleculares.
- e. Identificar los agentes bacterianos presentes en los pulmones afectados mediante estudios microbiológicos.
- f. Relacionar las alteraciones morfológicas pulmonares con los agentes virales involucrados en el desarrollo de la ERB.

## **1.2 Hipótesis**

Los virus asociados con el complejo ERB se encuentran en nuestro medio y tienen una participación relevante en el desarrollo de lesiones pulmonares en explotaciones de EC.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Período de estudio, localización y principales características de los establecimientos y de los animales

Durante el período 2015-2019, se realizó un estudio observacional transversal prospectivo en establecimientos de EC. Para esto, se efectuaron visitas puntuales a establecimientos de EC con casos de mortandad, con independencia del diagnóstico presuntivo emitido por el profesional veterinario a cargo del establecimiento.

En estas visitas, se realizaron necropsias y se seleccionaron los bovinos que presentaron lesiones pulmonares macroscópicas de ERB (n=73).

Los animales estudiados provinieron de 12 establecimientos de EC comerciales de las provincias de Buenos Aires (partidos de San Vicente, La Plata, General Belgrano, Marcos Paz, Magdalena, Rivadavia, y Arrecifes) y Santa Fe (partido de General López). La cantidad de cabezas por establecimiento varió entre 5.000 y 10.000 animales aproximadamente, con un rango de 135-200 animales por corral.

Todos los animales pertenecían a las categorías ternero, novillo y vaquillona. La edad varió entre 4 meses y 2 años de edad, destacando que 63 animales (86%) eran menores de un año. En cuanto al sexo, 43 fueron machos (59%) y 30, hembras (41%). En relación a la raza, 46 eran Aberdeen angus, 12 HolandoArgentino, 11 Hereford, 3 Cruza Aberdeen angus X Hereford, y 1 Cruza *Bos indicus* X *Bos taurus*. El peso varió entre 100 y 300 kg, con un 89% de los animales (n= 65) de menos de 200 kg.

## **2.2 Criterios de inclusión y de exclusión**

### **2.2.1 Criterio de inclusión:**

-Bovinos de EC que, al momento de la necropsia, presentaron lesiones pulmonares macroscópicas compatibles con ERB independientemente de la causa de muerte.

-Bovinos que, al momento de la necropsia, presentaron un grado de autólisis  $\leq$  a 2 (escala 0: sin autólisis, 1: leve autólisis, 2: moderada autólisis y 3: avanzada autólisis) (Fazzio y col., 2012).

### **2.2.2 Criterios de exclusión:**

-Bovinos que, al momento de la necropsia, presentaron grado 3 de autólisis (escala 0-3).

-Bovinos sin lesión pulmonar al momento de la necropsia.

-Bovinos con lesiones pulmonares distintas de ERB, tales como neumonía granulomatosa (tuberculosis), neumonía embólica, neumonía por aspiración, bronquitis/neumonía parasitaria, lesiones pulmonares asociadas a calcinosis enzoótica y reticulopericarditis traumática o disturbios circulatorios (edema pulmonar).

## **2.3 Plan sanitario**

Los planes sanitarios variaron ampliamente entre los 12 establecimientos de EC. En líneas generales, los aspectos más salientes de los planes implementados fueron: la administración de una única dosis de antiparasitario benzimidazol o endectocida al momento del arribo; la aplicación de una única dosis de vacuna polivalente clostridial y, en tres de los establecimientos, dos dosis de vacuna para la

prevención de enfermedades respiratorias, separadas por un intervalo de 15 días. Por último, dos de los establecimientos de EC realizaban metafilaxia con antibióticos (oxitetraciclina o tilmicosina) al ingreso, durante los meses de otoño e invierno.

#### **2.4 Anamnesis e historia clínica de los casos**

En cada visita, la anamnesis incluyó preguntas dirigidas a obtener información referente a la presencia de signos clínicos de ERB en algún corral en particular o en más de uno; a la aplicación de medidas terapéuticas (metafilaxia o tratamiento individual con antibióticos) para ERB y al tiempo de estadía de los animales en el establecimiento. También se consignaron otros datos acerca del manejo de los animales y/o establecimiento.

En cada caso, previo a la realización de necropsias, se consultó si el animal había presentado signos clínicos, si había recibido algún tratamiento y la fecha de muerte.

#### **2.5 Estudios anatomopatológicos**

Se realizó el estudio anatomopatológico (macroscópico y microscópico) de todos los animales seleccionados (n=73). Además, se obtuvieron muestras para estudios etiológicos complementarios (IHQ y PCR para la detección de agentes virales y el cultivo y aislamiento bacteriológico) que se llevaron a cabo solo en un subconjunto de los animales en estudio (n=44), debido al elevado costo de los insumos para las mencionadas técnicas.

### 2.5.1 Necropsia

Se realizó la necropsia completa de 73 animales. Se utilizó un protocolo estándar de registro que incluyó fecha, edad, peso, grado de autólisis, sexo, raza, días en el EC, historial de tratamientos y los hallazgos de necropsia (Protocolo del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP). El número de caravana de cada animal se utilizó para la identificación individual de las muestras obtenidas durante la necropsia.

Las lesiones pulmonares macroscópicas compatibles con ERB, se clasificaron en cuatro categorías:

- Bronconeumonía (BN): aquellos pulmones que presentaron áreas de consolidación de distribución craneoventral, generalmente bilateral y más o menos simétrica, de consistencia firme o friable, con exudado bronquial y presencia o ausencia de pleuritis. Esta categoría incluyó a las bronconeumonías supurativa, fibrinosa, fibrinosupurativa y caseonecrótica. En cada caso, el porcentaje de consolidación pulmonar total se calculó estableciendo visualmente y por palpación, el porcentaje de afección de cada lóbulo pulmonar y aplicando un factor de corrección, según lo propuesto por Fajt y col., 2003:  $(0,063 * \text{porcentaje afectado de la región craneal del lóbulo craneal derecho}) + (0,060 * \text{porcentaje afectado de la región caudal del lóbulo craneal derecho}) + (0,061 * \text{porcentaje afectado del lóbulo medio derecho}) + (0,352 * \text{porcentaje afectado del lóbulo caudal derecho}) + (0,053 * \text{porcentaje afectado de la región craneal del lóbulo craneal izquierdo}) + (0,049 * \text{porcentaje afectado de la región caudal del$

lóbulo craneal izquierdo) + (0,319 \* porcentaje afectado del lóbulo caudal izquierdo) + (0,043 \* porcentaje afectado del lóbulo accesorio).

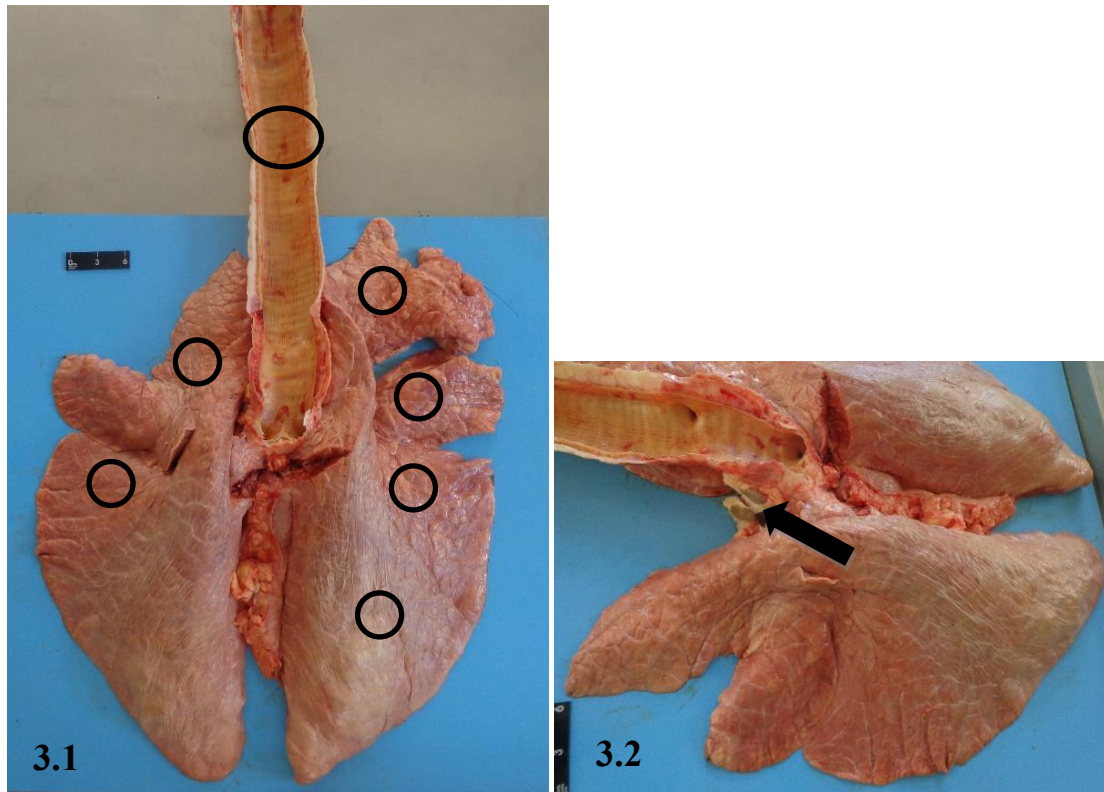
- Neumonía intersticial (NI): pulmones que no colapsaron a la apertura de la cavidad torácica, con impresiones costales sobre su superficie, consistencia gomosa o carnosa, con áreas difusas rojizas o color grisáceo y, en ocasiones, con edema y/o enfisema. Esta categoría incluyó a la neumonía intersticial y a la neumonía broncointersticial, cuya diferenciación se terminó de establecer mediante histopatología (Caswell y col., 2012).
- Bronquitis (Br): incluyó aquellos pulmones en que se observó exudado en las vías aéreas sin consolidación del parénquima o en que el pulmón presentó un patrón de atelectasia lobulillar.
- Pleuritis (Pl): incluyó pulmones que presentaron exudado fibrinoso en la superficie pleural sin consolidación del parénquima.

### **2.5.2 Obtención de muestras para estudios complementarios**

Para el estudio histopatológico, en todos los animales, se obtuvieron muestras de tráquea, linfonódulo traqueobronquial izquierdo y seis muestras de pulmón de las siguientes áreas: parte craneal del lóbulo craneal derecho, lóbulo medio derecho, parte craneal del lóbulo caudal derecho, parte caudo-dorsal del lóbulo caudal derecho, parte craneal del lóbulo craneal izquierdo y parte craneal del lóbulo caudal izquierdo (Figuras 3.1 y 3.2). El número de muestras de pulmón se basó en lo establecido por López y Martinson, 2017 quienes recomiendan al menos 4 secciones de pulmón. Además, se extrajeron muestras de otros órganos que presentaron lesión al momento de realizar la necropsia.



Las muestras recolectadas, de menos de 1 cm de espesor, se fijaron durante 48 h en solución de formaldehído neutro al 10% (pH: 7,2), conservando la relación 1/10 (tejido/formol). Posteriormente, se procesaron mediante las técnicas histológicas de rutina y se obtuvieron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina (Anexo 8).



**Figura 3.1.** Pulmón y tráquea: áreas elegidas para obtención de muestra para histopatología (círculos negros).

**Figura 3.2.** Linfonódulo traqueobronquial izquierdo (flecha negra).

Para los estudios de biología molecular, se obtuvieron muestras estériles de 3 cm<sup>3</sup> de la parte craneoventral de los lóbulos pulmonares izquierdos, que se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. La elección del sitio de muestreo se realizó sobre la base del conocimiento que, para el caso específico de BRSV, este virus se ha identificado con mayor frecuencia en los mencionados lóbulos (Larsen y col., 1999).

Para bacteriología, se obtuvieron muestras estériles de 5 cm<sup>3</sup> de la misma región pulmonar que la utilizada en los estudios moleculares. Las muestras se acondicionaron en forma estéril y se conservaron refrigeradas hasta su procesamiento dentro de las 24 h de obtenidas.

### **2.5.3 Histopatología**

La evaluación microscópica del pulmón incluyó la clasificación de las neumonías por su curso y por su patrón anatomopatológico. Para esto, se tomó en cuenta principalmente lo propuesto por Murray y col., 2017, como así también por Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008; Caswell y Williams, 2016; López y Martinson, 2017. En forma complementaria, se clasificó el tipo de lesión bronquiolar según lo planteado por Fulton y col., 2009.

#### **2.5.3.1 Clasificación de las neumonías según su patrón anatomopatológico y curso**

Teniendo en cuenta el área anatómica afectada (bronquios, alvéolos, intersticio y pleura) y el tipo de exudado (catarral, fibrinoso, supurativo, caseoso), se establecieron las seis categorías siguientes: bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS),

bronconeumonía caseonecrótica (BCN), neumonía intersticial (NI), bronquitis y/o bronquiolitis (BB), neumonía broncointersticial (NBI) y pleuritis (P).

#### 2.5.3.1.1 Bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS)

Bajo esta categoría se incluyeron en conjunto las bronconeumonías supurativas, fibrinosas y fibrinosupurativas. Se consideró bronconeumonía a la inflamación del pulmón caracterizada por presencia de exudado en los alvéolos y vías aéreas (neutrófilos, fibrina, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), con un inicio que se propaga a partir de la unión bronquiolo-alveolar. Ocasionalmente, como lesión acompañante, se incluyó la necrosis del epitelio alveolar y bronquiolar.

La subcategoría bronconeumonía supurativa comprendió los pulmones caracterizados por la presencia de abundantes neutrófilos viables y escasos degenerados, así como de macrófagos y mucus en la luz de bronquios, bronquiolos y alvéolos. El proceso se consideró de curso agudo cuando las muestras evaluadas presentaron marcados cambios vasculares (congestión, hiperemia, edema proteináceo, hemorragia alveolar). Contrariamente, se clasificaron como de curso crónico, aquellas muestras que evidenciaron escasos cambios vasculares y presencia de fibroblastos o fibrosis intraalveolar, atelectasia obstructiva, infiltración mononuclear e hiperplasia del BALT. Abscesos, adherencias pleurales fibrosas, fibrosis pulmonar, bronquiolitis obliterante y bronquiectasia se interpretaron como lesiones secuela.

La subcategoría bronconeumonía fibrinosa incluyó los pulmones que presentaron las siguientes lesiones: abundantes neutrófilos viables y necróticos (“células en grano de avena”), fibrina y macrófagos en la luz de bronquios,

bronquiolos y alvéolos; exudado fibrinoso, edema e inflamación en tabiques interlobulillares; necrosis y atenuación del epitelio bronquiolar junto con pleuritis fibrinosa y múltiples focos de necrosis coagulativa; escasa a moderada cantidad de bacterias en la luz de alvéolos y/o vías aéreas. En cuanto al curso, se consideraron casos agudos aquellos pulmones que evidenciaron marcados cambios vasculares tales como: congestión, hiperemia, trombosis, vasculitis con necrosis fibrinoide, hemorragia y edema. Se interpretaron como estadios subagudos las muestras que presentaron cambios vasculares más leves, predominante exudado de fibrina, macrófagos, neutrófilos necróticos y células histiocíticas multinucleadas en la luz alveolar y bronquial. Se consideraron crónicas las lesiones caracterizadas por la presencia de fibroblastos y fibrosis intraalveolar en septo interlobulillar y/o en pleura, además de bronquitis linfoplasmocítica o supurativa crónica. Secuestros, gangrena pulmonar, fibrosis pulmonar, bronquiectasia, adherencias pleurales fibrosas, abscesos y bronquiolitis obliterante se interpretaron como secuelas.

A la subcategoría bronconeumonía fibrinosupurativa se asignaron aquellos pulmones que presentaron combinación de los dos patrones de lesión antes descritos.

#### 2.5.3.1.2 Bronconeumonía caseonecrótica (BCN)

Bajo esta denominación se consideraron aquellas neumonías con similares características a las bronconeumonías de tipo supurativo más el agregado de bronquiectasia y focos de necrosis caseosa. El predominio de bronquiectasia con exudado caseoso y epitelio bronquial/bronquiolar conservado o levemente atenuado se interpretó como estadios tempranos de lesión. Se consideraron estadios crónicos,

aquellos pulmones que, además de las lesiones mencionadas, presentaron: erosión y necrosis del epitelio de las vías aéreas; alvéolos peribronquiolares con focos de necrosis caseosa, con un infiltrado periférico de neutrófilos y macrófagos y limitados externamente por tejido conjuntivo y una población mixta de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y raramente células gigantes); áreas de necrosis coagulativa y, en ocasiones, mineralización distrófica. Abscesos y secuestros se interpretaron como secuelas de este patrón de lesión.

#### 2.5.3.1.3 Neumonía intersticial (NI)

En esta categoría se incorporaron los pulmones en los que el proceso inflamatorio comprometió principalmente a las paredes alveolares (neumocitos) sin afección de las vías aéreas (bronquios y bronquiolos). Se consideraron de curso agudo (fase exudativa) los pulmones que presentaron congestión en capilares del septo alveolar, enfisema, edema, membranas hialinas, hipertrofia de los macrófagos alveolares e infiltración de neutrófilos y/o eosinófilos en el septo alveolar. Se interpretaron de curso subagudo (fase proliferativa), lesiones similares a las anteriores, pero con el agregado de infiltrado de linfocitos y macrófagos en el septo alveolar y escasa a moderada hiperplasia de neumocitos tipo II. Se categorizaron de curso crónico aquellas lesiones en que, a lo descripto, se sumaron fibrosis del septo alveolar, moderada a marcada hiperplasia de neumocitos tipo II, infiltrado de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, fibroblastos y miofibroblastos en el intersticio alveolar, además de enfisema y metaplasia escamosa del epitelio alveolar (lambertosis o bronquiolización alveolar). Fibrosis del parénquima pulmonar con enfisema se consideraron secuelas de este tipo de neumonía.

#### 2.5.3.1.4 Bronquitis y/o bronquiolitis (BB)

Aquí se incluyeron las lesiones de bronquitis y/o bronquiolitis con o sin necrosis epitelial, y sin lesión a nivel alveolar (neumocitos). Se consideraron lesiones tempranas: la necrosis y descamación epitelial, pérdida de cilias, infiltración celular, edema e hiperemia en lámina propia, exudado en la luz (mucus, neutrófilos, fibrina) y presencia de sincitios epiteliales en pared o luz bronquiolar. Se interpretaron como de curso crónico los pulmones que presentaron hiperplasia/metaplasia de células caliciformes, hiperplasia de las glándulas submucosas bronquiales, hiperplasia/metaplasia epitelial y bronquiectasia. En esta última fase, también se incluyeron: fibrosis peribronquiolar, hiperplasia del BALT y bronquiolitis obliterante.

#### 2.5.3.1.5 Neumonía broncointersticial (NBI)

Este tipo de neumonía se caracterizó por una combinación de las lesiones mencionadas en las categorías 2.5.3.1.3 y 2.5.3.1.4.

#### 2.5.3.1.6 Pleuritis (P)

En esta categoría se incorporaron los pulmones que evidenciaron pleuritis sin lesiones de neumonía. La presencia de exudado serofibrinoso o fibrinopurulento, linfangiectasia, linfangitis, trombosis linfática, hiperemia, edema, hemorragia se consideraron lesiones iniciales. En cambio, la observación de tejido de granulación asociado al exudado de fibrina y/o a áreas de fibrosis se interpretó como lesión crónica. Adherencias pleurales fibrosas fueron consideradas secuelas.

### 2.5.3.2 Clasificación del tipo de lesión bronquiolar

Según la presencia y el tipo de lesión bronquiolar se establecieron las siguientes 5 categorías: necrosis bronquiolar (NB), bronquiolitis obliterante (BO), necrosis bronquiolar con bronquiolitis obliterante (NB+BO), otras lesiones bronquiolares (OLB) y sin lesión bronquiolar (SLB).

#### 2.5.3.2.1 Necrosis bronquiolar (NB)

Esta categoría se caracterizó por la atenuación, necrosis y descamación de las células epiteliales de los bronquiolos.

#### 2.5.3.2.2 Bronquiolitis obliterante (BO)

En esta categoría se incluyeron pulmones en los que la lesión bronquiolar se caracterizó por la formación de pólipos de tejido fibroso o tejido de granulación cubierto de epitelio con oclusión parcial de la luz bronquiolar.

#### 2.5.3.2.3 Necrosis bronquiolar con bronquiolitis obliterante (NB+BO)

Esta categoría comprendió los pulmones con combinación de las lesiones descritas en 2.5.3.2.1 y 2.5.3.2.2.

#### 2.5.3.2.4 Otras lesiones bronquiolares (OLB)

En esta categoría se incluyeron los casos con otras lesiones distintas a las presentadas en los tres apartados anteriores tales como: bronquiolitis aguda, hiperplasia del BALT, hiperplasia/metaplasia epitelial, hiperplasia de células caliciformes, fibrosis peribronquiolar, moderada infiltración celular y



edema/hiperemia en lámina propia, sincitios epiteliales bronquiolares o alveolares y bronquiectasia.

#### 2.5.3.2.5 Sin lesión bronquiolar (SLB)

Esta categoría comprendió aquellos casos en que no se identificaron lesiones microscópicas en los bronquiolos.

## **2.6 Estudios inmunohistoquímicos para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1**

### **2.6.1 Técnicas de inmunohistoquímica para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 a partir de muestras de pulmón**

Para los estudios de IHQ se seleccionó, en los 44 casos estudiados, una muestra correspondiente a la región craneoventral del pulmón.

Se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (Anexo 9) que se estandarizó siguiendo las recomendaciones de Ramos-Vara y col., 2008. Brevemente, los cortes se desparafinaron y rehidrataron y la actividad de la peroxidasa endógena se inhibió con solución de metanol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS, 30 minutos. Luego se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas de acuerdo al protocolo de trabajo planteado para cada virus (Anexo 9) y, posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C.

Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas fueron: BRSV (AB1128, Millipore, Mass, USA - dilución 1:1000), BVDV (3.12F1, VMRD, WA, USA - dilución 1:500), BPIV-3 (Mab 1B6, VMRD, WA, USA - dilución 1:500) y BoHV1

(F2, VMRD, WA, USA - dilución 1:3000). Para diluir los anticuerpos se utilizó el producto comercial Da Vinci Green Diluent, Biocare Medical, CA, USA.

Se utilizaron los siguientes controles:

Controles de tejidos positivos provistos por los doctores Francisco Uzal - University of California, Davis (BRSV y BoHV1) y Eleonora Morrell - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce (BVDV). Para el caso de BPIV-3 se utilizaron pulmones de cobayos provenientes de una reproducción experimental realizada por nuestro grupo de trabajo.

Controles de tejidos negativos: se utilizaron pulmones provenientes de frigorífico sin lesiones macroscópicas ni microscópicas compatibles con ERB, siendo negativos por IHQ y técnicas moleculares.

Controles negativos de reactivo: cortes de pulmón en los que se sustituyó el anticuerpo primario por el diluyente comercial utilizado para diluir los anticuerpos primarios (Da Vinci Green Diluent, Biocare Medical, CA, USA).

Controles positivos de reactivo: cortes de pulmón que se incubaron con un anticuerpo pancitoqueratina (AE1/AE3, Leica Biosystems, IL, USA) esperable de dar señal en las estructuras epiteliales del pulmón.

Los protocolos de recuperación antigénica y los métodos de bloqueo de uniones inespecíficas empleados en cada caso se presentan en el anexo 9.

Se emplearon dos sistemas de detección dependiendo el agente. En el caso de BRSV se utilizó el kit de detección polímero ImmPRESS™ HRP Anti-Goat IgG

(Vector, CA, USA) y para BoHV1, BPIV-3 y BVDV, el kit de detección LSAB2® System HRP (Dako, CA, USA). El revelado se realizó mediante diaminobencidina (DAB, Dako, CA, USA).

### **2.6.2 Técnicas de inmunohistoquímica para detección de BoHV1 a partir de muestras de tráquea**

Se aplicó IHQ para detección de antígeno de BoHV1 en las muestras de tráquea de los 44 casos estudiados en el conocimiento que, además de producir lesiones de ERB en pulmón producto tanto de alteraciones del sistema inmune como del propio efecto viral sobre el tejido, BoHV1 puede tener presentaciones con lesiones que afectan principalmente el aparato respiratorio superior (Ellis, 2009; Jones y Chowdhury., 2010). La técnica se realizó según lo expuesto en el apartado anterior para muestras de pulmón (2.6.1).

### **2.7 Técnicas de diagnóstico molecular para detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 a partir de muestras de pulmón**

De cada muestra de pulmón (3 cm<sup>3</sup>) se obtuvo una submuestra de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y se colocó en un mortero. Luego se agregó arena estéril y 1 ml de medio de mantenimiento (E-MEM suplementado con 2% de SFB) y se procedió al macerado del órgano. Una vez disgregado completamente el tejido, el homogenato se transfirió a un tubo de centrifuga. El material obtenido se centrifugó a 6000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para detección de genoma viral por técnicas moleculares.

Para detección de BoHV1 se aplicó una técnica de PCR múltiple que diferencia los tipos 1 y 5 del virus (Claus y col., 2005); RT-PCR para detección de BPIV-3 (Maidana y col., 2012) y BVDV (Vilcek., 1994) y, en el caso de BRSV, se utilizó la técnica de RT- *nested*PCR (RT-nPCR) (Vilcek y col., 1994). En todos los ensayos de PCR se incluyeron un control positivo y controles negativos para cada paso de la técnica (extracción de ácidos nucleicos, síntesis del ADNc y PCR). Cada una de las técnicas de diagnóstico molecular se realizó según lo expuesto en el capítulo 2 apartados 2.7.2.1.1 a 2.7.2.1.5 de esta tesis.

## **2.8 Estudios microbiológicos**

Se realizó cultivo bacteriológico aeróbico y en microaerofilia a partir de cada muestra obtenida. Las muestras se sembraron en agar MacConkey y agar tripticosa soja adicionado con 10% de sangre ovina defibrinada. Las placas sembradas se incubaron en condiciones aeróbicas y microaerófilas (5-10% CO<sub>2</sub>) a una temperatura de 37°C durante 48-72 h. Los aislamientos se identificaron de acuerdo a la pureza y cantidad de colonias, morfología y aspecto de las colonias, producción de hemólisis, tinción de Gram y pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, ureasa, bilis esculina, citrato de Simmons, reducción de nitratos, reacción del indol, reacción de Voges-Proskauers, reacción del rojo de metilo, oxidación-fermentación de glucosa, fermentación de hidratos de carbono y agar TSI (Mac Faddin, 2003). Para la realización de las pruebas se utilizaron los cultivos en su fase de crecimiento exponencial.

Catalasa: se utilizó el reactivo  $H_2O_2$  10 volúmenes. En un portaobjetos se enfrentaron colonias provenientes de placas de Petri con el reactivo. La presencia de burbujas en 1 minuto se consideró positivo.

Oxidasa: reactivo para diamino metil amina al 1% para detectar la presencia de citocromo oxidasa. El reactivo se impregnó en una tira de papel de filtro y con una pipeta Pasteur de vidrio se agregó la colonia. El cambio de color a azul intenso en aproximadamente un minuto se consideró una reacción positiva (Mac Faddin, 2003).

Ureasa: se utilizó el medio de Christensen utilizando el medio urea base (Britania, Argentina) más el agregado de urea estéril al 40%. El medio fraccionado en pico de flauta se sembró por estría y, se incubó durante 24h. La aparición de un color rosado se consideró positivo.

Prueba de Citrato: se sembró por estría en pico de flauta en agar citrato de Simmon (Britania, Buenos Aires, Argentina) y, se incubó 24 h. La aparición del cambio de color de verde botella a azul se consideró positivo.

Nitritos: se utilizó el caldo de nitrato, el cual se sembró e incubó por el término de 12-24 h. Se agregaron los reactivos de Barrit A (ácido sulfamínico al 0.8% en ácido acético glacial 5N) y B ( $\alpha$ -naftilamina al 0.5% en ácido acético glacial 5N) (Britania, Buenos Aires, Argentina). El desarrollo de un color rosado se consideró positivo (Mac Faddin, 2003).

Prueba de Indol: se utilizó el medio SIM, Sulfuro Indol Movilidad (Britania, Buenos Aires, Argentina). Se sembró por puntura y luego de incubar 24 h a  $37^\circ C$ , se observó la movilidad a partir del punto de inoculación y la producción de hidrógeno

sulfurado (color negro). La presencia de indol se evidenció mediante el reactivo de Kovacs (Britania, Buenos Aires, Argentina), (alcohol isoamilo, p-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado), para lo que se agregaron unas gotas del reactivo a la superficie del medio. La presencia de un color rosado en un período de 1 minuto se consideró positivo.

Utilización de glucosa y formación de hidrógeno sulfurado: se utilizó el agar triple hierro, TSI Three Sugar Iron (Britania, Buenos Aires, Argentina), se sembró la columna por puntura y el pico de flauta por estría, se incubó durante 24 h a 37°C. La producción de hidrógeno sulfurado se detectó por la presencia de color negro en el medio. La utilización de glucosa, lactosa y sacarosa se confirmó por el cambio de color del medio de cultivo de naranja a amarillo. La producción de gas a partir de la glucosa se detectó por la presencia de burbujas de aire en el medio de cultivo.

Oxidación y fermentación de glucosa: se utilizó el medio de Hugh Leifson con el agregado de glucosa. Se sembraron dos tubos de medio de cultivo, uno en aerobiosis y el otro en anaerobiosis (con el agregado de vaselina) y se incubó durante 24 h a 37°C. Se consideraron positivos el viraje de color de verde a amarillo (oxidación), en el medio sin vaselina (aerobiosis) y la ocurrencia de fermentación en el medio con vaselina.

Fermentación de hidratos de carbono: se realizó en caldo básico con rojo de fenol como indicador de pH (Mac Faddin, 2003) para los siguientes hidratos de carbono: lactosa, sacarosa, manitol, dulcitol, salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, rafinosa, rammosa, melobiosa, trehalosa y xilosa.

En la tabla 3.1 se presentan las características principales de cada especie bacteriana.

**Tabla 3.1.** Principales características de cada especie bacteriana.

Bacteria	Gram	Oxi	Móvil	Indol	Cit	Hemol $\beta$	NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>	McK	CO <sub>2</sub>
<i>M. haemolytica</i>	G -	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. somni</i>	G -	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>P. multocida</i>	G -	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>T. pyogenes</i>	G +	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	G -	-	-	-	+	-	+	+	-

*M. haemolytica*: *Mannheimia haemolytica*, *H. somni*: *Histophilus somni*, *P. multocida*: *Pasteurella multocida*, *T. pyogenes*: *Trueperella pyogenes*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*. Gram: tinción de Gram; Oxi: prueba de oxidasa, Móvil: movilidad; Cit: prueba de citrato; Hemol  $\beta$ : beta hemolisis; NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>: prueba de reducción de nitratos a nitritos; McK: crecimiento en agar MacConkey. CO<sub>2</sub>: producción de burbujas de CO<sub>2</sub> en la fermentación de hidratos de carbono.



## **2.9 Diagnóstico final o causa de muerte**

En todos los animales se estableció el diagnóstico definitivo o causa de muerte sobre la base de los antecedentes clínicos, hallazgos de necropsia, lesiones histológicas y/o estudios complementarios. Los casos en los que no se pudo determinar la causa de muerte se designaron como “sin posibilidad diagnóstica” (SPD).

### **2.9.1 Diagnóstico final de ERB**

Si bien todos los animales presentaron lesiones compatibles con ERB, ya que este fue un criterio de inclusión, las mismas se consideraron la causa de la muerte cuando se presentaron con las siguientes características (adaptado de Gagea y col., 2006):

- Neumonía intersticial o broncointersticial generalizada o acompañada por lesiones de bronconeumonía.
- Bronconeumonía crónica con afección de más del 40-50% del pulmón, sin identificación de otra causa de muerte.
- Bronconeumonía fibrinosa con compromiso de, al menos, el 30% del pulmón, con hemorragias en serosas o en músculos sugestivas de endotoxemia y sin identificación de otra causa aparente de muerte.
- Traqueítis fibrinonecrótica severa difusa.

Los animales en los que se identificaron lesiones de ERB, pero sin la extensión y las características mencionadas, se clasificaron como muertos por otra causa.

## **2.10 Análisis estadístico**

Para estimar las diferencias en el período de tiempo entre el ingreso al establecimiento hasta la muerte, tanto en animales que murieron debido a ERB como en aquéllos que presentaron lesiones de ERB, pero murieron por otras causas, se ajustó un modelo de supervivencia de Kaplan-Meier -Proc lifetest, SAS 9.4 (SAS, 2003).

En relación con la detección de agentes virales se generó la variable IHQ+PCR la cual incluyó las pruebas diagnósticas de IHQ y de PCR en paralelo, es decir que un animal fue positivo para un virus cuando se obtuvieron resultados positivos mediante IHQ o por la técnica de PCR o por ambas técnicas. En todos los casos la valoración e interpretación de los datos de detección de agentes se realizó en términos descriptivos.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Causa de muerte**

En el 56% de los animales incluidos en el estudio (41/73), la causa de muerte fue ERB, mientras que en el 44% restante (32/73), si bien se observaron lesiones

pulmonares de ERB, las mismas no cumplieron con los criterios definidos para ser consideradas causa de muerte de estos animales.

Las causas de muerte distintas de ERB fueron: polioencefalomalacia (n=4; 5%), acidosis (n=3; 4%), síndrome de no adaptación (n=3; 4%), meningoencefalitis trombótica (n=1; 1%), peritonitis (n=1; 1%), enfermedad de las mucosas-BVD (n=1; 1%), trauma medular (n=1; 1%), endocarditis (n=1; 1%), urolitiasis (n=1; 1%), pericarditis (n=1; 1%), gastroenteritis verminosa (n=1; 1%), timpanismo gaseoso (n=1; 1%), salmonelosis (n=1; 1%) y coccidiosis (n=1; 1%). Los animales restantes fueron considerados como SPD (n=11; 15%).

### **3.2 Historial de tratamientos de los animales incorporados al estudio**

En consideración al historial de tratamientos previos, 26 animales (36%) recibieron tratamiento con antibióticos en algún momento durante los 7 días previos a la muerte por haberse detectado signología clínica compatible con ERB. Los signos principalmente identificados fueron: disnea, depresión, exudado mucopurulento en ollares e hipertermia. En los restantes 47 animales (64%) no se detectaron signos clínicos y, por lo tanto, no fueron tratados.

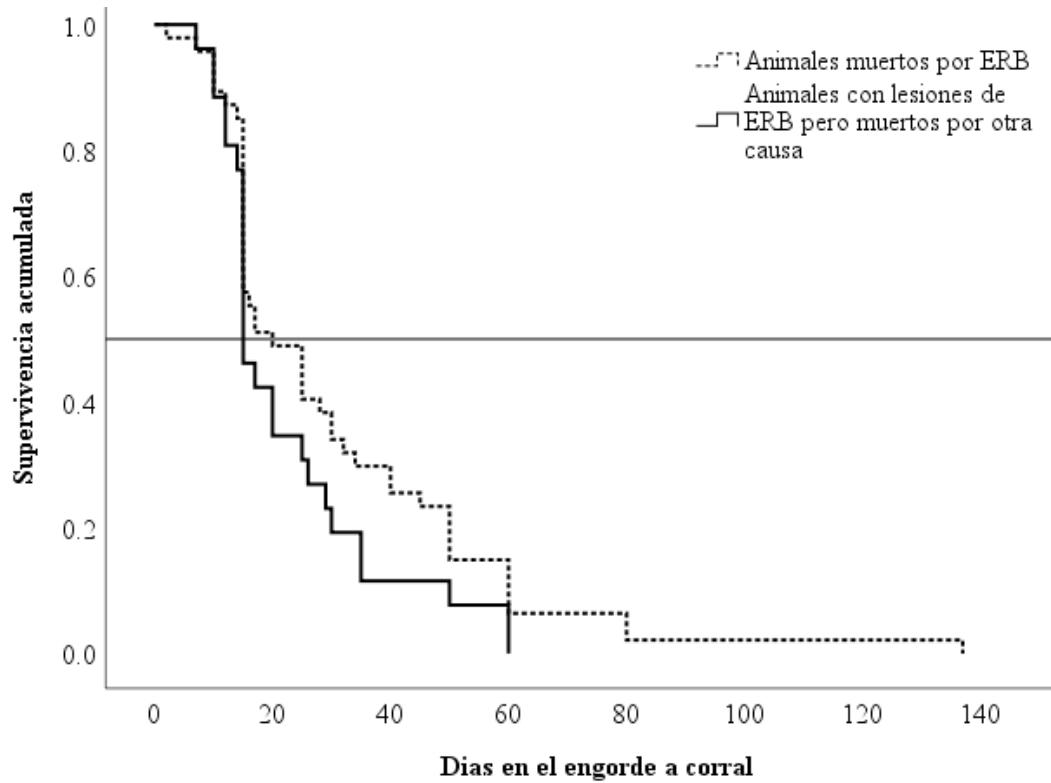
### **3.3 Distribución de la mortalidad de los animales con lesión de ERB**

#### **3.3.1 Estaciones del año**

Del total de los animales en estudio, la mayor parte de las lesiones de ERB se encontraron en las necropsias realizadas durante el otoño y el invierno, con porcentajes del 49% y 32% respectivamente. En menor escala, el 15% de los casos ocurrieron en primavera y 4% en verano.

### 3.3.2 Período de engorde

La distribución de las muertes de los animales con lesiones de ERB a lo largo del período de engorde se presenta en la figura 3.3. El test estadístico de Kaplan-Meier no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las funciones de supervivencias acumulada de los animales muertos por ERB (P50=20 IC95%= 15-32) y la de los animales muertos por otra causa (P50=17 IC95%= 15-25), cuando ocurrieron el 50% de las muertes en cada grupo (P=0,612). El 75% de las muertes ocurrieron durante los primeros 35 días de encierre.

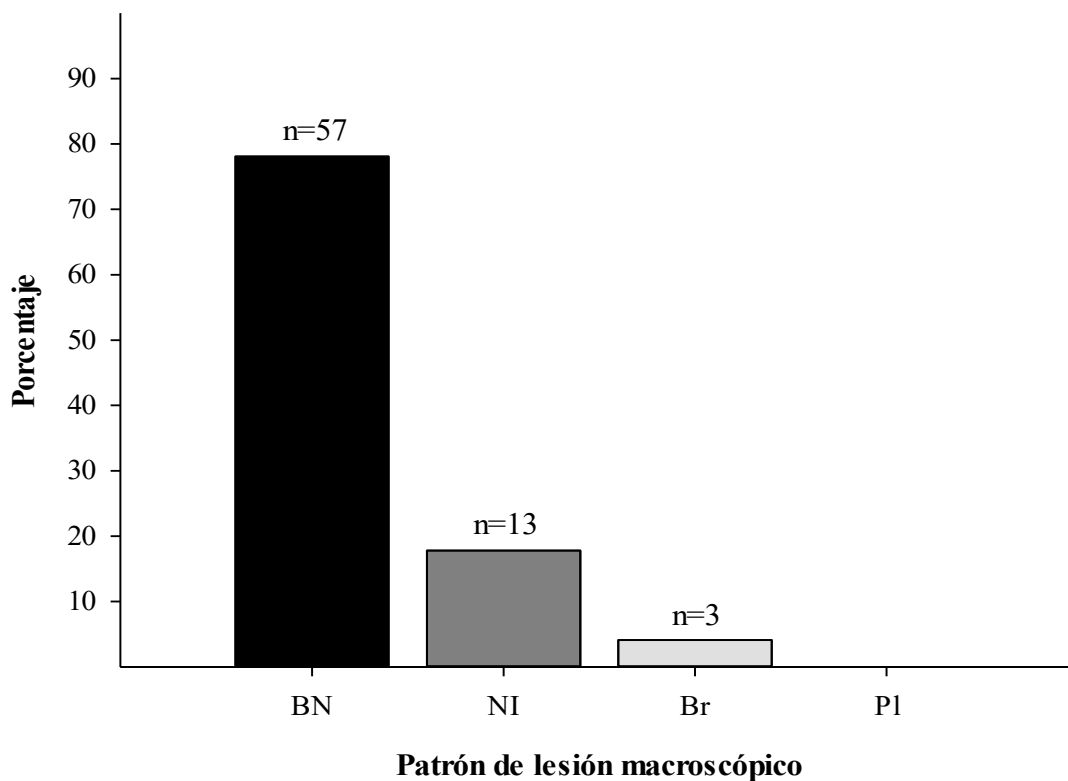


**Figura 3.3.** Curvas de supervivencia en animales muertos por ERB (n=41) y animales con lesiones de ERB muertos por otra causa (n=32). Se consideró Día 0 al día de arribo de los animales al engorde a corral. ERB: enfermedad respiratoria bovina.

### **3.4 Lesiones macroscópicas**

#### **3.4.1 Pulmón**

En la figura 3.4 se muestran las frecuencias de los patrones de lesión macroscópica en pulmón.



**Figura 3.4.** Patrón de lesiones pulmonares macroscópicas de ERB en engorde a corral (n=73). BN: consolidación pulmonar craneoventral compatible con bronconeumonía. NI: pulmones con lesiones compatibles con neumonía intersticial o broncointersticial. Br: pulmones con bronquitis y/o atelectasia lobulillar. Pl: pleuritis sin lesión en parénquima pulmonar.

Como se observa en la figura 3.4 el patrón BN fue el más frecuente. A continuación, se mencionan algunas de las lesiones macroscópicas identificadas en este grupo.

Se observaron lesiones típicas de bronconeumonía como ser: focos de necrosis coagulativa (74%; 42/57), marcada distensión de tabiques interlobulillares con fibrina y edema (86%; 49/57), pleuritis fibrinosa (60%; 34/57) y exudado mucopurulento en bronquios (23%; 13/57) (Figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8). Dentro del mismo patrón de lesión, en el 19% (11/57) de los pulmones, se reconocieron focos de necrosis caseosa, de aspecto seco y textura friable (Figuras 3.9 y 3.10). Abscesos (Figura 3.11) y bronquiectasia (Figura 3.12) estuvieron presentes en el 23% (13/57) y el 33% de los casos (19/57) respectivamente.

Por último, en el 21% de los animales con patrón BN (12/57) se observó pericarditis fibrinosa (Figura 3.13), lesión que fue interpretada como complicación o secuela de los casos de bronconeumonía con pleuritis fibrinosa.

Las lesiones macroscópicas típicas de las categorías NI y Br se muestran en las figuras 3.14, 3.15 y 3.16. Los casos pertenecientes al primer grupo presentaron falta de colapso pulmonar a la apertura de la cavidad torácica, pulmones con consistencia gomosa, marcado edema y enfisema en tabiques interlobulillares y, ocasionalmente, impresiones costales en la superficie pleural. En la categoría Br, se observó en pulmón exudado mucopurulento en vías aéreas, así como atelectasia multifocal de lobulillos pulmonares.

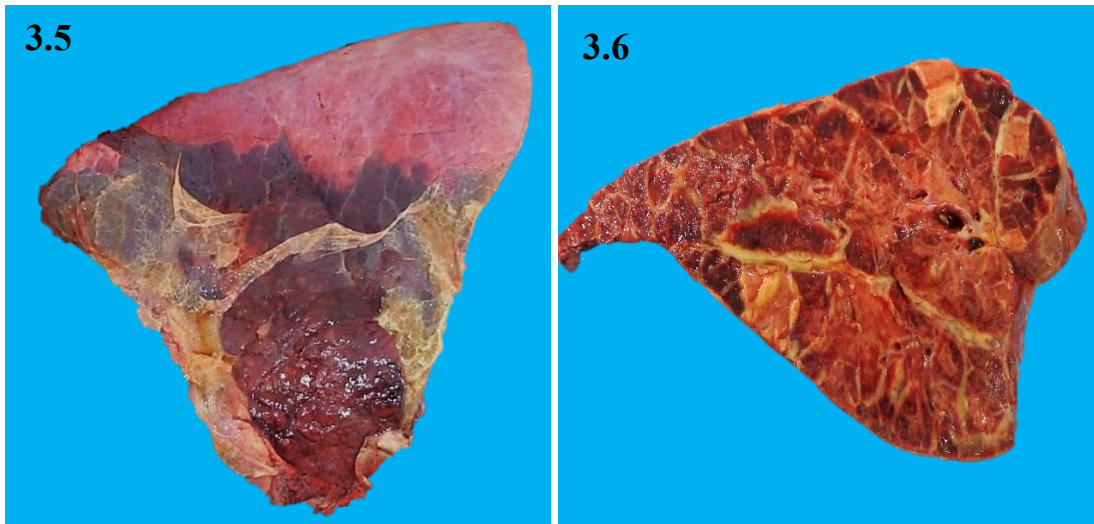


### **3.4.2 Tráquea**

El 5% de los animales analizados (4/73) presentaron lesión macroscópica en tráquea. En estos, se observó ulceración multifocal a coalescente con abundante fibrina adherida a la mucosa, cambios que se interpretaron como traqueítis fibrinonecrotizante difusa severa aguda (Figura 3.17).

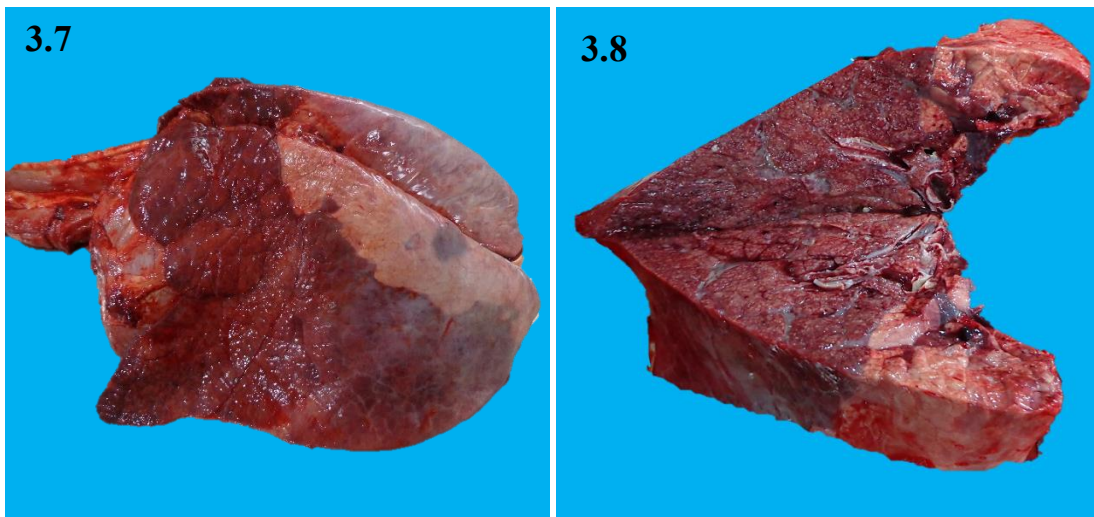
### **3.4.3 Linfonódulos traqueobronquiales**

Se observó linfadenomegalia en el 93% de los animales (68/73).



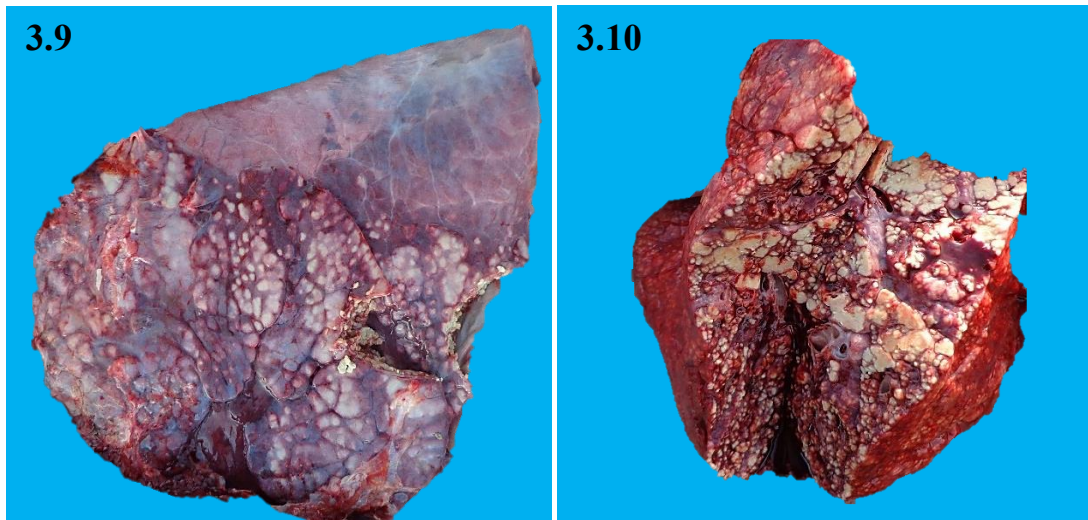
**Figura 3.5.** Bronconeumonía fibrinosa con pleuritis fibrinosa aguda.

**Figura 3.6.** Superficie de corte del pulmón de la figura 3.5. Septos interlobulillares distendidos por edema y exudado fibrinoso. Múltiples focos de necrosis coagulativa.



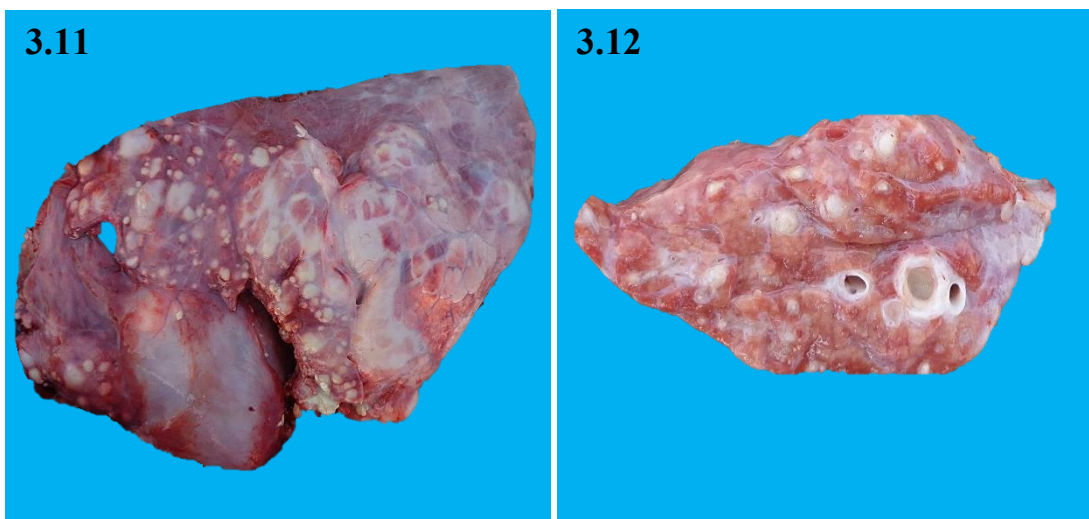
**Figura 3.7.** Bronconeumonía supurativa aguda. Se observa extensa consolidación craneoventral pulmonar. El color rojo del área afectada es propio del estadio agudo de lesión

**Figura 3.8.** Superficie de corte del pulmón de la figura 3.7. Los cambios en profundidad del parénquima pulmonar son similares a lo observado en superficie, destaca el patrón lobulillar de expansión de la lesión,



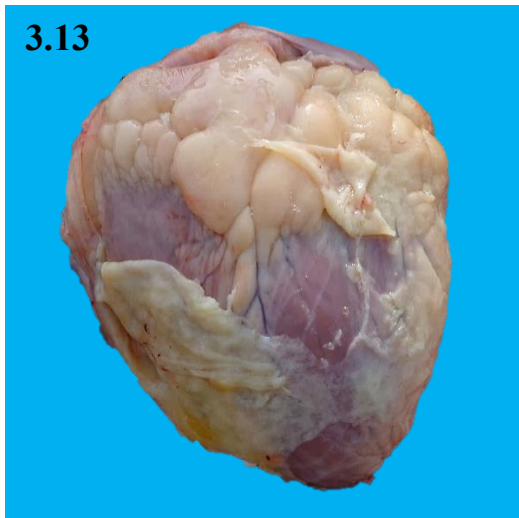
**Figura 3.9.** Bronconeumonía crónica con consolidación craneoventral y múltiples focos de necrosis caseosa.

**Figura 3.10.** Superficie de corte del pulmón de la figura 3.9. Múltiples focos de necrosis caseosa con tendencia coalescer.

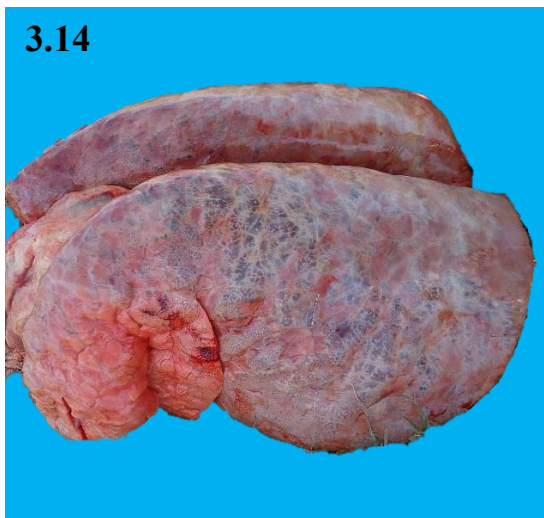


**Figura 3.11.** Bronconeumonía supurativa craneoventral. Destacan gran cantidad de abscesos.

**Figura 3.12.** Superficie de corte del pulmón de la figura 3.11. En la profundidad del parénquima pulmonar se confirma la presencia de abscesos, además de bronquiectasia con abundante exudado mucopurulento en las vías aéreas.



**Figura 3.13.** Pericarditis fibrinosa difusa severa aguda. Una densa malla de fibrina recubre la superficie epicárdica.



**Figura 3.14.** Neumonía intersticial difusa aguda. Se observan pulmones no colapsados y con marcado enfisema

**Figura 3.15.** Superficie de corte del pulmón de la figura 3.14. Textura carnosa. Marcado edema y enfisema en tabiques interlobulillares.



**Figura 3.16.** Neumonía lobulillar (en patrón “tablero de ajedrez”). Al corte se observó exudado mucopurulento en vías aéreas (bronquitis aguda).



**Figura 3.17.** Traqueítis fibrinonecrotizante difusa severa aguda.

### 3.5 Lesiones microscópicas

#### 3.5.1 Lesiones microscópicas en pulmón

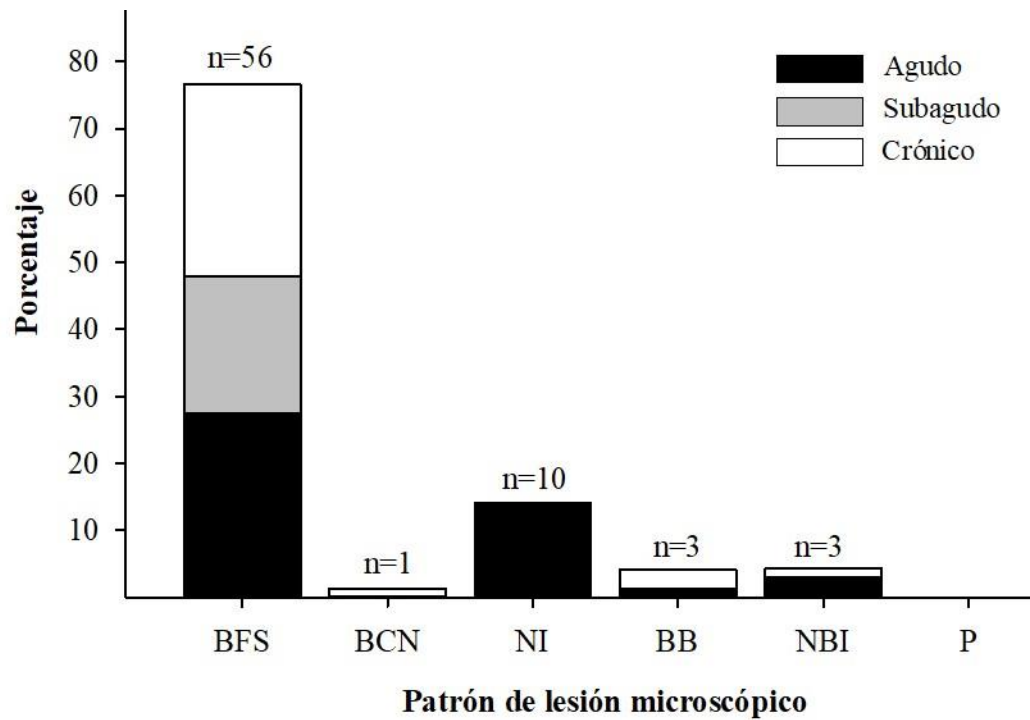
La frecuencia de patrones microscópicos de lesión pulmonar y su curso se presentan en la figura 3.18. Las lesiones de BFS fueron las más frecuentes (77%; 56/73).

El 33% (24/73) de los pulmones presentaron más de un patrón histopatológico; sin embargo, al momento de definir el caso, se ponderó el patrón de lesión predominante (Figura 3.18). Las combinaciones de patrones microscópicos de lesión pulmonar fueron: BFS+BCN (n=11), BFS+BB (n=3), BFS+NBI (n=2), BFS+NBI+BB (n=2), BFS+NI (n=4), NI+NBI+BB (n=1) y NI+NBI (n=1).

Independientemente del patrón de lesión pulmonar, 45% de las lesiones fueron de curso agudo, 21% subagudo y un 34% crónico.

Tomando como base solamente el tipo de lesión bronquiolar, la mayoría de la población presentó alguna lesión en estas vías aéreas (71/73). Las frecuencias fueron las siguientes: 60% NB, 5% BO, 21% NB+BO y 11% OLB. Solo el 3% de los animales no presentó lesión bronquiolar.

Ninguno de los animales (n=73) presentó cuerpos de inclusión (CI) en células epiteliales bronquiales, neumocitos, macrófagos alveolares o en sincitios epiteliales (bronquiales y alveolares).



**Figura 3.18.** Lesiones pulmonares microscópicas de ERB de engorde a corral (n=73). BFS: bronconeumonía fibrinosupurativa, BCN: bronconeumonía caseonecrótica, NI: neumonía intersticial, BB: bronquitis y/o bronquiolitis, NBI: neumonía broncointersticial, P: pleuritis.

### 3.5.1.1 Bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS)

Dentro de la categoría BFS (77% 56/73), se observaron lesiones que pertenecieron a las subcategorías bronconeumonía supurativa (8/56) (Figuras 3.19 y 3.20), bronconeumonía fibrinosa (20/56) (Figura 3.21) y bronconeumonía fibrinosupurativa (28/56). Las lesiones más frecuentes en animales con BFS fueron: focos de necrosis coagulativa en el 75% de los pulmones (42/56); leucocitos necróticos (“células en grano de avena”) en el 66% (37/56); vasculitis y/o trombosis en el 64% (36/56) y pleuritis en el 61% (34/56). Estos hallazgos se ejemplifican en las figuras 3.21, 3.22, 3.23 y 3.24. Por otro lado, un subgrupo (18%; 10/56) presentó focos de necrosis caseosa.

En relación con las vías aéreas, el 75% (42/56), 4% (2/56) y 21% (12/56) presentó NB, BO y NB+BO respectivamente.

En 5/56 animales con patrón BFS se identificaron escasos sincitios epiteliales. En 2/5, los sincitios se observaron asociados al epitelio bronquiolar y en 3/5 se encontraron en la luz alveolar. Los 2 pulmones con sincitios bronquiolares presentaron NB y, en relación al curso, un caso resultó agudo y el otro, crónico. Los 3 individuos con sincitios alveolares presentaron un patrón de BFS crónica y en relación a la categoría de lesión bronquiolar, 2 evidenciaron NB y uno NB+BO.

El curso de las lesiones clasificadas dentro del patrón BFS fue agudo, subagudo y crónico en el 36% (20/56), 27% (15/56) y 37,5% (21/56) de los animales.



El 54% (30/56) de los pulmones presentaron secuelas entre las que se identificaron: fibrosis del parénquima pulmonar, bronquiolitis obliterante, fibrosis peribronquiolar, bronquiectasia, abscesos y adherencias pleurales fibrosas.

#### 3.5.1.2 Bronconeumonía caseonecrótica (BCN)

Solo el 1% de los animales en estudio presentó el patrón BCN (1/73). Este caso se caracterizó por lesiones de bronquiectasia, exudado caseoso en la luz de bronquios y bronquiolos junto con múltiples focos de necrosis caseosa en el parénquima pulmonar (Figuras 3.25 y 3.26). Por el tipo de lesión bronquiolar el animal se incluyó en la categoría NB+BO.

El curso de lesión fue crónico y el pulmón presentó fibrosis del parénquima, bronquiolitis obliterante, fibrosis peribronquiolar, bronquiectasia, abscesos y adherencias pleurales fibrosas como secuelas.

#### 3.5.1.3 Neumonía intersticial (NI) y neumonía broncointersticial (NBI)

Al analizar los casos de NI y NBI conjuntamente (18% - 13/73), el 92% (12/13) presentó infiltrado linfoplasmocítico y de macrófagos en septos alveolares; el 85% (11/13) evidenció edema alveolar, el 46% (6/13), membranas hialinas y el 8% (1/13), hiperplasia de neumocitos tipo II. Estas lesiones se ejemplifican en las figuras 3.27, 3.28, 3.29 y 3.30.

Dentro de los pulmones clasificados como NI (10/73), 8/10 presentaron OLB que consistieron en hiperplasia del BALT (8/8) e infiltrado de eosinófilos en lámina propia de los bronquios, bronquiolos y septos alveolares (2/8).

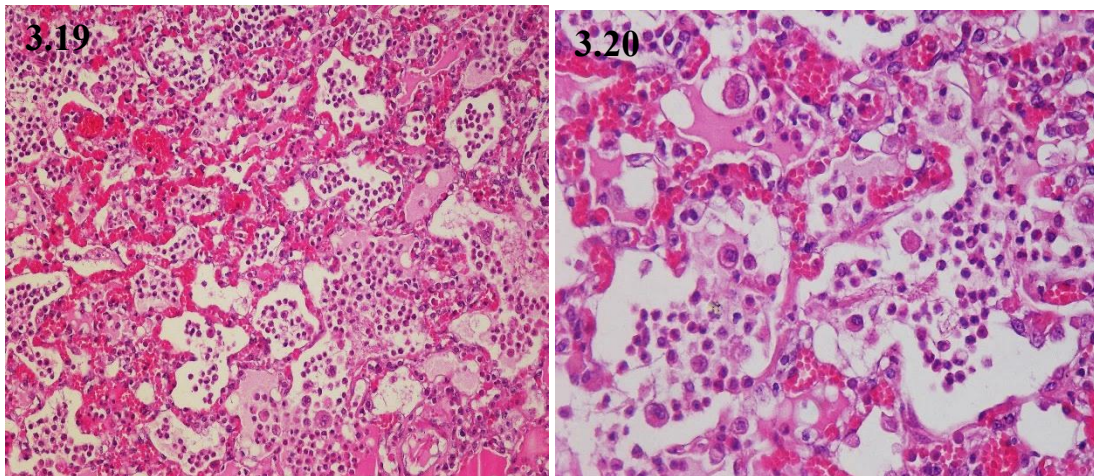
Las vías aéreas en los individuos con NBI (3/73) presentaron NB en 1/3 y NB+BO en 2/3. De estos últimos casos, uno de ellos exhibió escasos sincitios bronquiolares.

El curso de lesión fue agudo en todos los pulmones con NI. Para la categoría NBI dos casos fueron agudos, incluyendo aquel que presentó sincitios bronquiolares, y uno crónico. Entre las secuelas de lesiones pulmonares que se identificaron en ambos grupos (NI - 7/11; NBI - 2/2) se observaron: adherencias pleurales fibrosas, fibrosis del parénquima pulmonar con enfisema, bronquiolitis obliterante y fibrosis peribronquiolar.

#### 3.5.1.4 Bronquitis y/o bronquiolitis

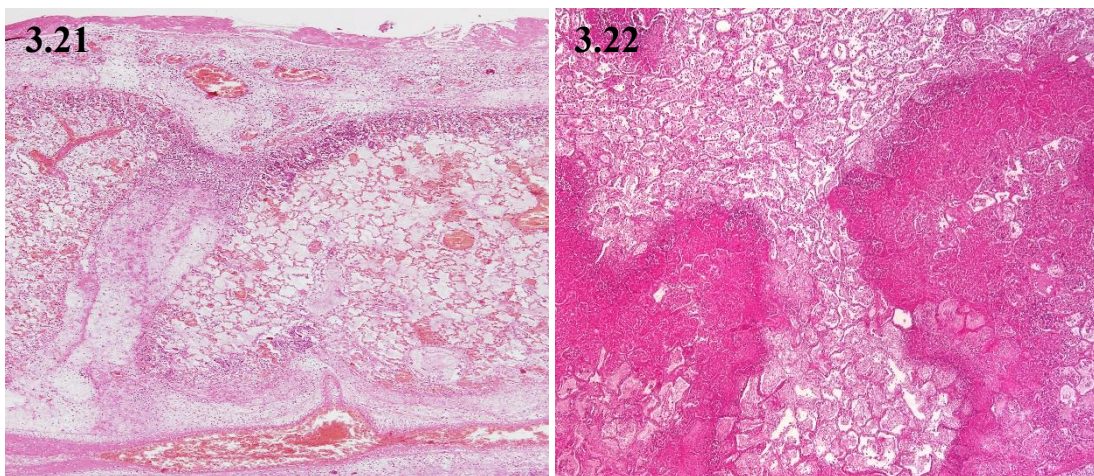
Los pulmones con BB (4% - 3/73) presentaron atelectasia alveolar. El tipo de lesión bronquiolar fue BO y exudado catarral en 2/3 animales. El restante, presentó NB e infiltrado de eosinófilos en lámina propia de bronquios y bronquiolos y en los septos alveolares.

El curso fue agudo y crónico en 1 y 2 animales, respectivamente. Los pulmones presentaron secuelas de lesiones pulmonares entre las que se observaron: adherencias pleurales fibrosas, bronquiolitis obliterante y fibrosis del parénquima pulmonar con enfisema.



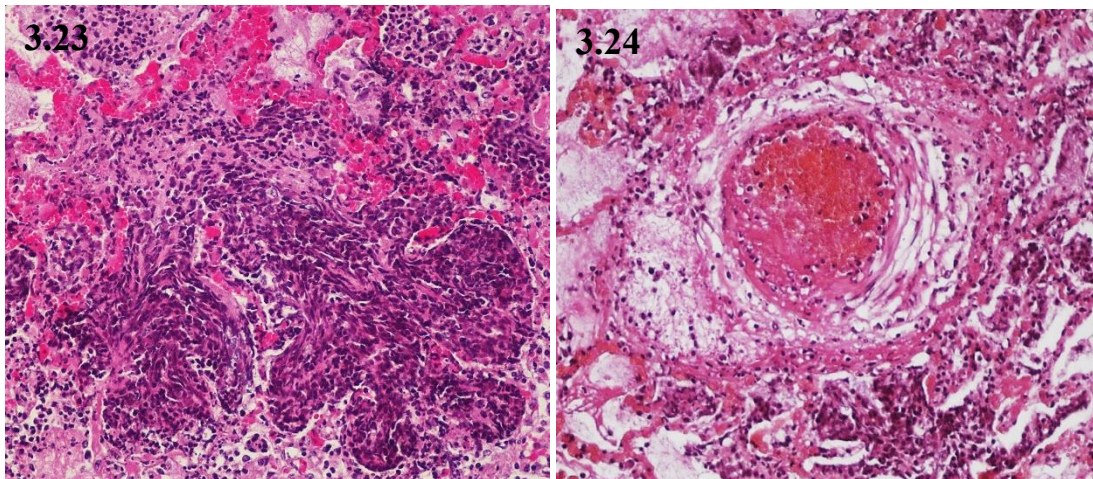
**Figura 3.19.** Bronconeumonía supurativa severa aguda. Se observa moderada hiperemia y edema alveolar además de abundante infiltrado celular en la luz de los alvéolos. H&E. Obj. 10x.

**Figura 3.20.** Bronconeumonía supurativa. Gran cantidad de neutrófilos y macrófagos en luz alveolar H&E. Obj. 40x.



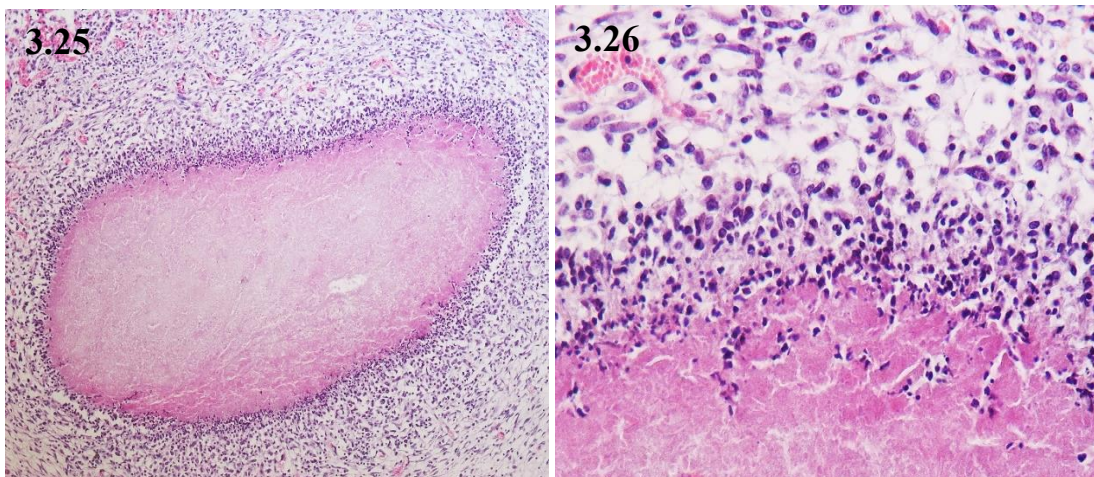
**Figura 3.21.** Bronconeumonía fibrinosa severa aguda. La pleura evidencia hiperemia y marcado edema. Sobre su superficie se reconoce exudado fibrinoso. Los tabiques interlobulillares se encuentran engrosados con similares cambios que los observados en la pleura H&E. Obj. 4x.

**Figura 3.22.** Bronconeumonía fibrinosa, múltiples focos de necrosis coagulativa caracterizados por áreas circunscriptas de alvéolos que presentan necrosis pero que conservan su arquitectura. Estos focos se encuentran delimitados por abundante infiltración celular inflamatoria. H&E. Obj. 4x.



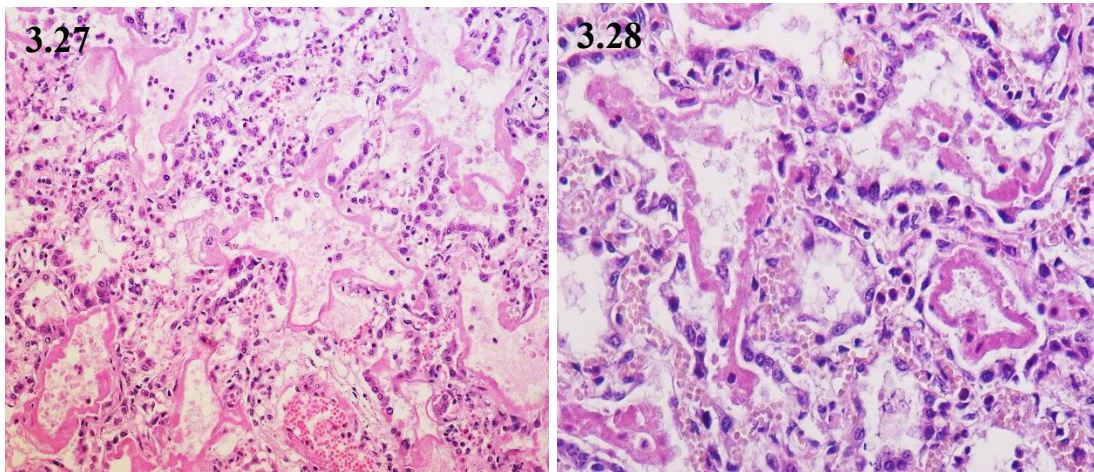
**Figura 3.23.** Bronconeumonía fibrinosa. Leucocitos necróticos (“células en grano de avena”) en luz alveolar H&E. Obj. 20x.

**Figura 3.24.** Bronconeumonía fibrinosa. Vasculitis y trombosis en una arteria de mediano calibre del parénquima pulmonar H&E. Obj. 20x.



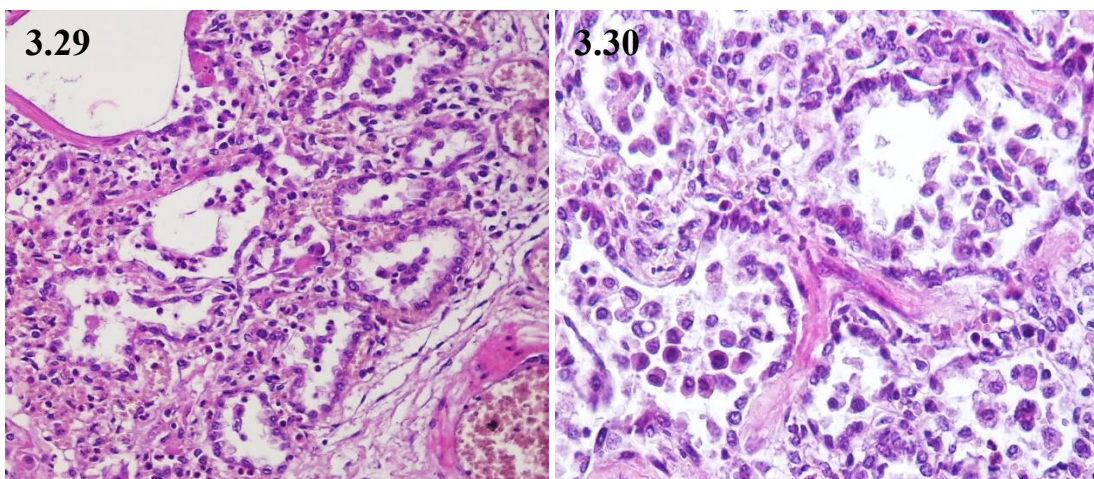
**Figura 3.25.** Bronconeumonía caseonecrótica. Foco de necrosis caseosa caracterizado por una masa central acidófila, acelular y amorfa delimitada por una corona de células inflamatorias. H&E. Obj. 10x.

**Figura 3.26.** Bronconeumonía caseonecrótica. Detalle del foco de necrosis caseosa en el que destacan detritus nucleares y neutrófilos intactos en la periferia, con tejido de granulación circundante. H&E. Obj. 40x.



**Figura 3.27.** Neumonía intersticial difusa subaguda. Se observan los septos alveolares engrosados con hiperplasia de neumocitos tipo II y membranas hialinas. H&E. Obj. 20x.

**Figura 3.28.** Neumonía intersticial. Detalle de la epitelización alveolar (hiperplasia de neumocitos tipo II) y las membranas hialinas homogéneas y fuertemente acidófilas sobre la superficie alveolar. H&E. Obj. 40x.



**Figura 3.29.** Neumonía intersticial. Marcada hiperplasia de neumocitos tipo II que tapizan la pared alveolar casi en su totalidad. Intersticio alveolar engrosado con infiltración celular. H&E. Obj. 20x.

**Figura 3.30.** Neumonía intersticial crónica. Hiperplasia de neumocitos tipo II, fibrosis del septo alveolar y aumento del número de los macrófagos alveolares H&E. Obj. 40x.

### **3.5.2 Lesiones microscópicas en tráquea**

Se observaron lesiones microscópicas en tráquea en el 47% (34/73) de los individuos incluidos en el estudio.

Las lesiones microscópicas identificadas fueron: 82% (28/34) traqueítis linfoplasmocítica leve; 12% (4/34) traqueítis fibrinonecrótica severa; 3% (1/34) traqueítis erosiva leve y 3% (1/34) hiperplasia moderada del epitelio traqueal.

### **3.5.3 Lesiones microscópicas en linfonódulos traqueobronquiales**

El 95% (69/73) de los animales el linfonódulo traqueobronquial izquierdo presentó lesión microscópica.

Los hallazgos microscópicos fueron: 93% (64/69) hiperplasia reactiva; 3% (2/69) linfadenitis supurativa o fibrinosupurativa; 3% (2/69) hiperplasia reactiva con linfadenitis supurativa o fibrinosupurativa y 1% (1/69) enfisema.

## **3.6 Detección de agentes virales (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1)**

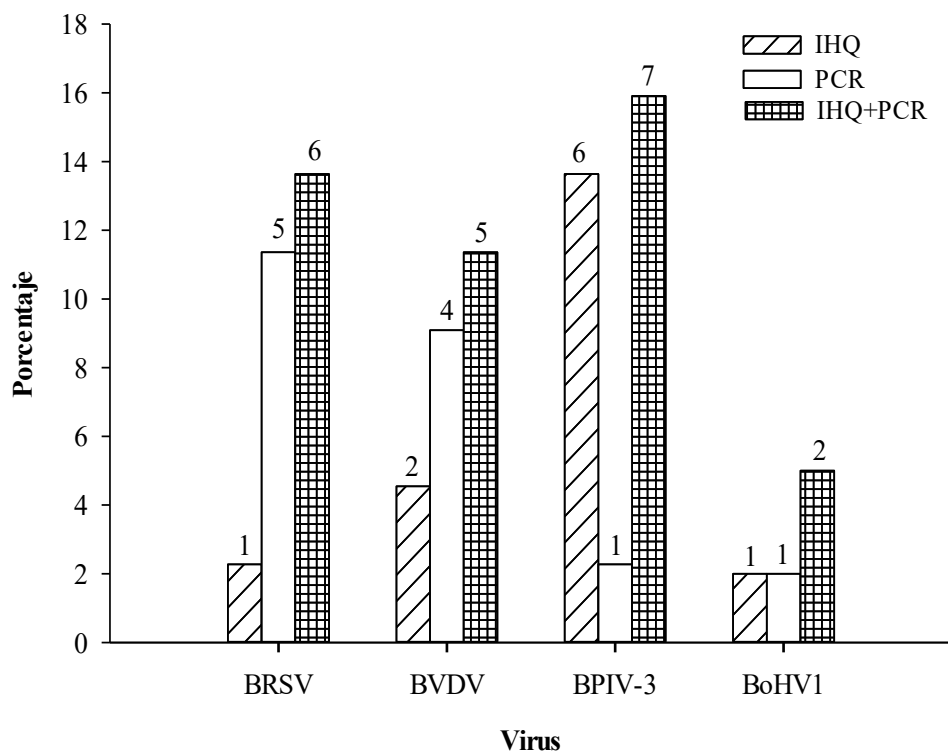
En los anexos 10 y 11 muestran el detalle de las detecciones virales en cada uno de los animales y las respectivas lesiones pulmonares (macroscópicas y microscópicas) identificadas.

### **3.6.1 Detección de agentes virales a partir de muestras de pulmón**

El 36% de los animales evaluados (16/44) resultaron positivos a uno o más de los 4 virus estudiados (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1) mediante las técnicas de IHQ y/o de PCR.

Al estimarse la detección viral obtenida mediante el uso de cada técnica por separado, el 23% de los animales (10/44) fue positivo por IHQ y de igual manera, 23% de los casos (10/44) resultaron positivos por PCR.

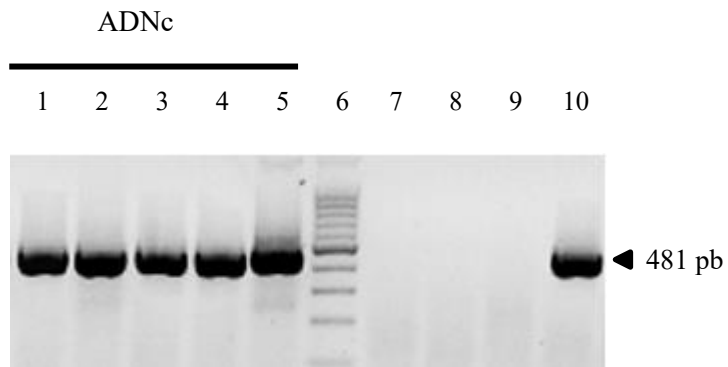
En la figura 3.31 se presenta la frecuencia de detección de los virus mediante inmunohistoquímica, técnicas de biología molecular (PCR) o combinación de ambas técnicas (n=44). Las figuras 3.32, 3.33, 3.34 y 3.35 muestran los resultados positivos por técnicas de biología molecular.



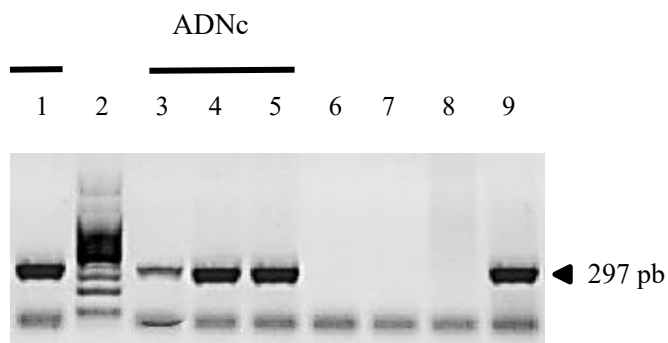
**Figura 3.31.** Frecuencia de detección de agentes virales en muestras de pulmón con lesiones de ERB (n=44).

IHQ: inmunohistoquímica. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. IHQ+PCR: casos positivos a IHQ, PCR o a ambas técnicas. BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1.

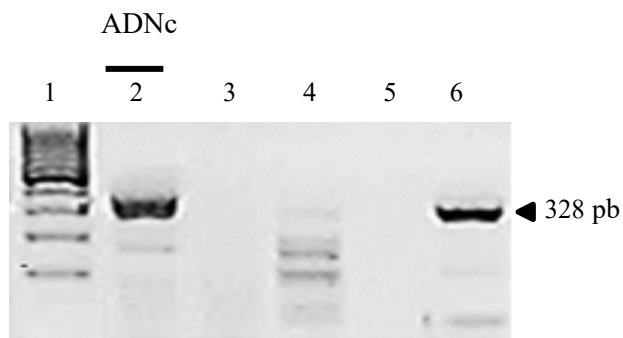




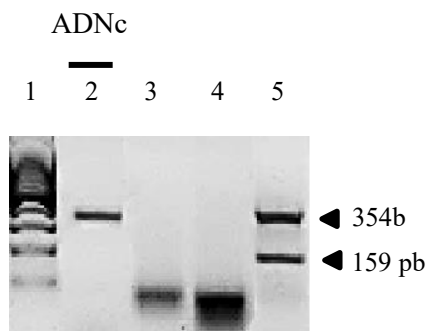
**Figura 3.32.** Muestras de pulmón positivas a BRSV mediante la técnica de RT-*nested* PCR. Calles 1-5: pulmones positivos a BRSV. Muestras provenientes de los animales: A848, B773, D573, A100 y A775. Calle 6 marcador de peso molecular (100 pb); calles 7-9: controles de reactivos (*non-template*) para cada uno de los pasos de la RT-*nested* PCR; calle 10: control positivo (ARN extraído a partir de células infectadas con BRSV).



**Figura 3.33.** Muestras de pulmón positivas a BVDV mediante la técnica de RT-PCR. Calles 1, 3, 4 y 5: pulmones positivos a BVDV. Muestras provenientes de los animales: D573, A724, B106 y 14. Calle 2 marcador de peso molecular (100 pb); calles 6-8: controles de reactivos (*non-template*) para cada uno de los pasos de la RT-*nested* PCR; calle 9: control positivo (ARN extraído a partir de células infectadas con BVDV).



**Figura 3.34.** Muestra de pulmón positiva a PIV-3 mediante la técnica de RT-PCR. Calle 1 marcador de peso molecular (100 pb). Calle 2 pulmón positivo a BPIV-3 (A9040). Calles 3-5: controles de reactivos (*non-template*) para cada uno de los pasos de la RT-PCR; calle 6: control positivo (ARN extraído a partir de células infectadas con BPIV-3).

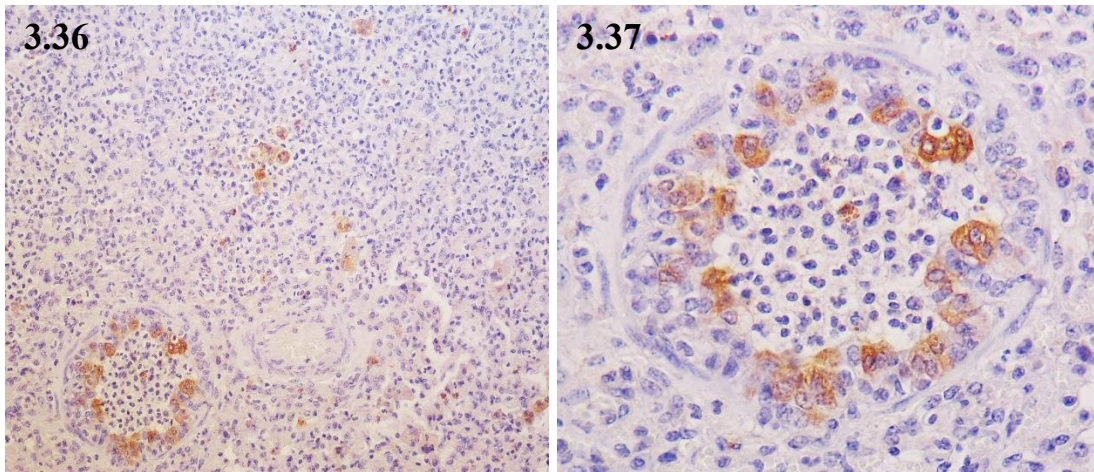


**Figura 3.35.** Muestra de pulmón positiva a BoHV1 mediante la técnica de PCR. Calle 1 marcador de peso molecular (100 pb). Calle 2 pulmón positivo a BoHV1 (1287). Calles 3 y 4: controles de reactivos (*non-template*) de extracción y PCR respectivamente. Calle 5: controles positivos (ADN extraído a partir de células infectadas con BoHV1 y 5).

La inmunomarcación para BRSV se observó en el citoplasma de células epiteliales bronquiales, bronquiolares, neumocitos y en menor medida, en macrófagos y sincitios epiteliales (Figuras 3.36 y 3.37). En el caso de BPIV-3, se observó detección de antígenos en el citoplasma de las células epiteliales bronquiales, bronquiolares, neumocitos y macrófagos alveolares (Figuras 3.38 y 3.39). Los casos positivos a BVDV por IHQ presentaron señal en el citoplasma de células epiteliales bronquiales, bronquiolares, macrófagos intersticiales, alveolares y túnica media de los vasos sanguíneos (Figuras 3.40 y 3.41). Por último, el caso positivo a BoHV1 exhibió inmunomarcación en el citoplasma de células epiteliales bronquiales, bronquiolares, macrófagos alveolares y en los focos de necrosis (Figuras 3.42 y 3.43).

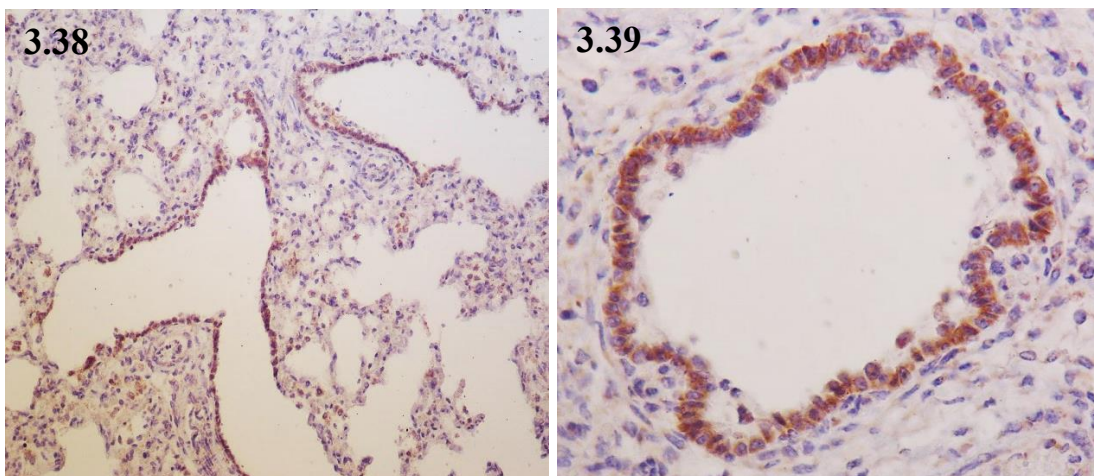
La concordancia entre IHQ y PCR fue nula para BRSV, BPIV-3 y BoHV1. Un único caso de BVDV resultó positivo por ambas técnicas.

Si bien todos los animales presentaron lesión pulmonar de ERB, la mayor frecuencia de detección de BRSV, BVDV y BPIV-3 se encontró en los individuos con diagnóstico final (causa de muerte) distinto a ERB. La figura 3.44 presenta las detecciones de los distintos virus y su relación con el diagnóstico final del caso.



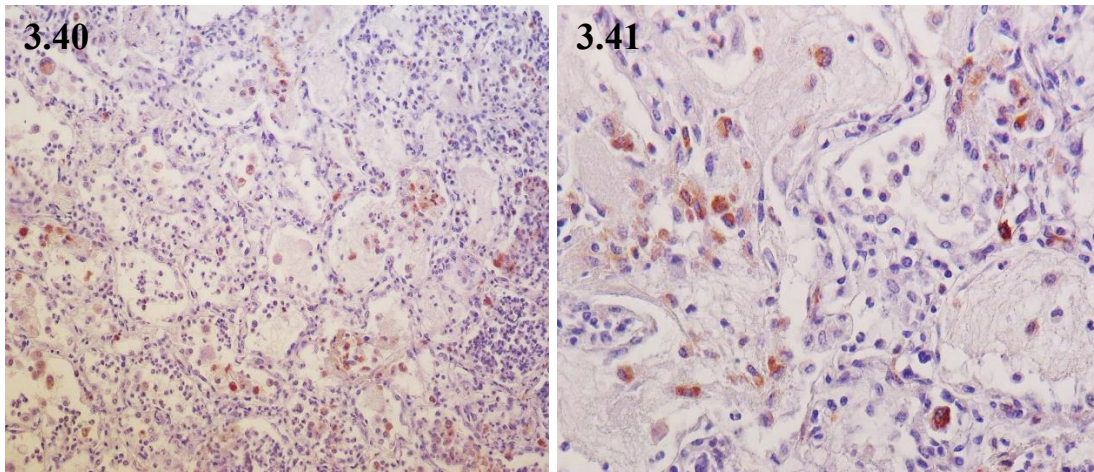
**Figura 3.36.** Marcación positiva para BRSV por inmunohistoquímica en pulmón bovino. La marcación positiva se encuentra en el citoplasma de las células epiteliales bronquiales, neumocitos y en menor medida, en macrófagos y sincitios epiteliales (Obj. 20x).

**Figura 3.37.** Detalle de la inmunomarcación para BRSV en células epiteliales bronquiales y sincitios epiteliales (Obj. 40x).

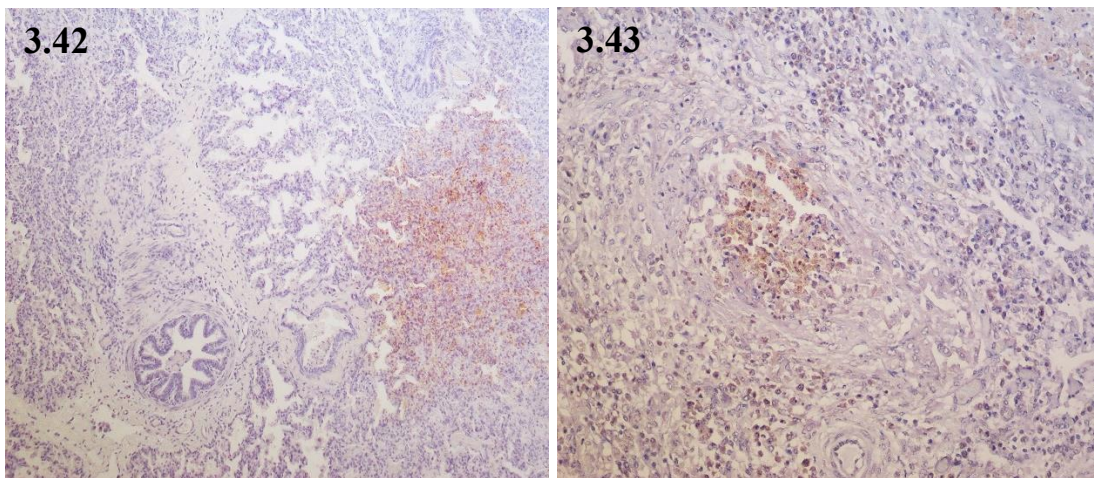


**Figura 3.38.** Marcación positiva para BPIV-3 por inmunohistoquímica en pulmón bovino. La marcación positiva se encuentra en el citoplasma de las células epiteliales bronquiales, neumocitos y macrófagos alveolares (Obj. 20x).

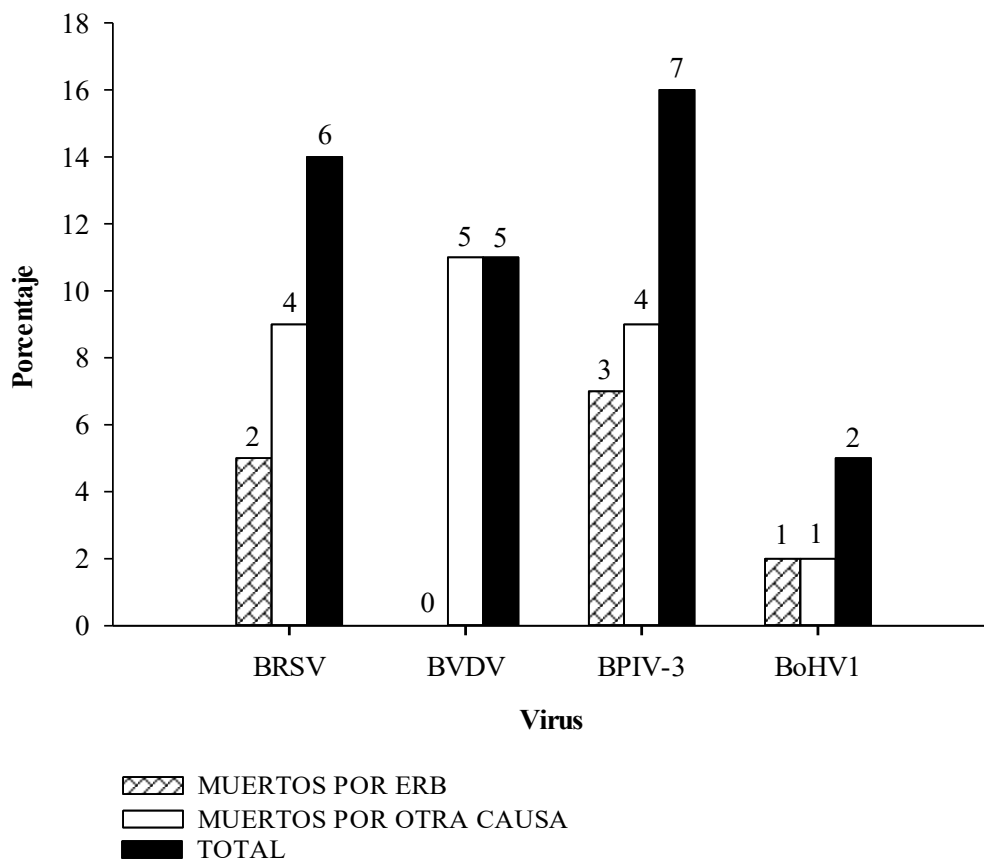
**Figura 3.39.** Detalle de la inmunomarcación para BPIV-3 en células epiteliales bronquiales (Obj. 40x).



**Figura 3.40.** Marcación positiva para BVDV por inmunohistoquímica en pulmón bovino. La marcación positiva se encuentra en el citoplasma de macrófagos intersticiales y alveolares. (Obj. 20x).  
**Figura 3.41.** Detalle de la inmunomarcación para BVDV en macrófagos intersticiales y alveolares (Obj. 40x).



**Figura 3.42.** Marcación positiva para BoHV1 por inmunohistoquímica en pulmón bovino. La marcación positiva se encuentra en el citoplasma de células epiteliales bronquiolares, macrófagos alveolares y en un foco de necrosis (Obj. 10x).  
**Figura 3.43.** Detalle de la inmunomarcación para BoHV1 en células epiteliales bronquiolares y macrófagos alveolares (Obj. 20x).

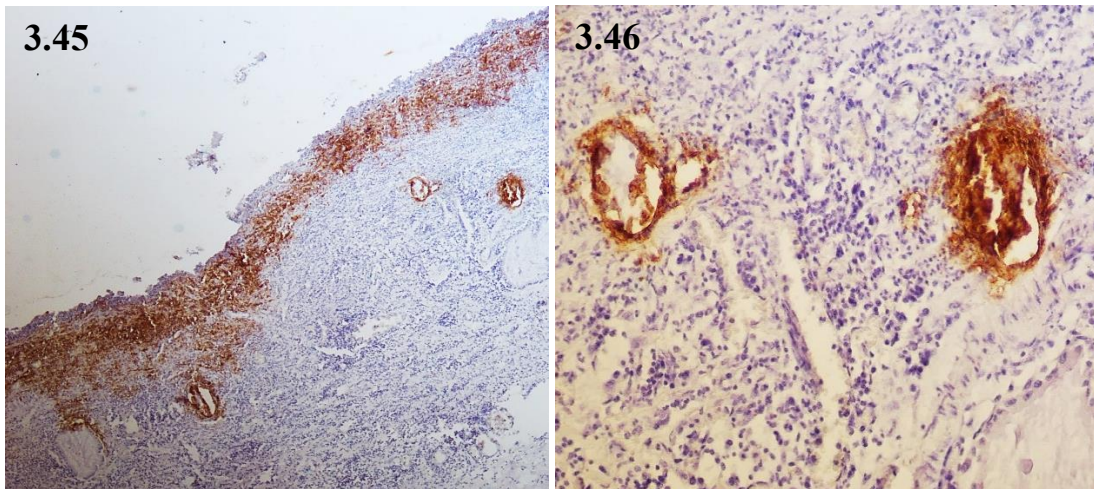


**Figura 3.44.** Detección de agentes virales por IHQ y/o PCR en pulmones con lesiones de ERB y su relación con el diagnóstico final del caso (n=44).

MUERTO POR ERB: animales con lesiones de ERB en los que el diagnóstico final fue ERB (n=21). MUERTO POR OTRA CAUSA: animales con lesiones de ERB en los que el diagnóstico final no fue determinado o fue distinto de ERB (n=23). TOTAL: animales con lesiones pulmonares de ERB independientemente de la causa de muerte (n=44). BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1. ERB: enfermedad respiratoria bovina.

### **3.6.2 Detección de BoHV1 a partir de muestras de tráquea**

De las 44 muestras de tráquea evaluadas por IHQ, 2 animales con traqueítis fibrinonecrótica fueron positivos a BoHV1. La inmunomarcación se observó principalmente en el citoplasma de células epiteliales descamadas, así como en el epitelio de las glándulas de la lámina propia y submucosa (Figura 3.45 y 3.46). Los pulmones de estos animales resultaron negativos por IHQ y PCR para este virus.



**Figura 3.45.** Marcación positiva para BoHV1 por inmunohistoquímica en tráquea de bovino. La marcación positiva se encuentra en el epitelio de las glándulas de la lámina propia y submucosa, así como en el exudado fibrinonecrótico de la superficie de la mucosa ulcerada (Obj. 4x).

**Figura 3.46.** Detalle de la marcación en el epitelio de las glándulas de la lámina propia (Obj. 20x).



### **3.7 Detección de agentes virales en función de las lesiones microscópicas**

#### **3.7.1 Distribución de la detección viral en función del patrón microscópico de lesión pulmonar**

Se obtuvieron resultados positivos de detección viral a partir de los pulmones que presentaron distintos patrones de lesión (BFS, NI, BB y NBI). Las frecuencias de detección de uno o más virus fue del 33% (11/33) para BFS y del 38% (3/8) para NI. Solo en los pulmones con patrón de lesión BFS se detectaron, ya sea mediante IHQ y/o PCR, todos los virus en estudio.

En los pulmones con patrón BFS, BRSV y BPIV-3 se detectaron en el 9% y en el 16% de los casos, respectivamente. En los pulmones con NI se identificó BRSV en el 25% de los casos. En la tabla 3.2 se presenta la detección viral en función del patrón microscópico de lesión pulmonar.

**Tabla 3.2.** Detección viral en los diferentes patrones histopatológicos de lesión pulmonar en casos de ERB (n=44).

Virus	Patrón histopatológico de lesión pulmonar					
	BFS (n=33)	BCN (n=1)	NI (n=8)	BB (n=1)	NBI (n=1)	P (n=0)
<b>BRSV*</b> (n=6)	9% (4)	0% (0)	5% (2)	0% (0)	0% (0)	-
<b>BVDV*</b> (n=5)	5% (2)	0% (0)	5% (2)	2% (1)	0% (0)	-
<b>BPIV-3*</b> (n=7)	16% (7)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
<b>BoHV1*</b> (n=2)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	2% (1)	-

BFS: bronconeumonía fibrinosupurativa, BCN: bronconeumonía caseonecrótica, NI: neumonía intersticial, BB: bronquitis y/o bronquiolitis, NBI: neumonía broncointersticial, P: pleuritis. BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1. \*Casos positivos por IHQ, PCR o a ambas técnicas.

### 3.7.2 Detección de agentes virales en función de las lesiones bronquiolares

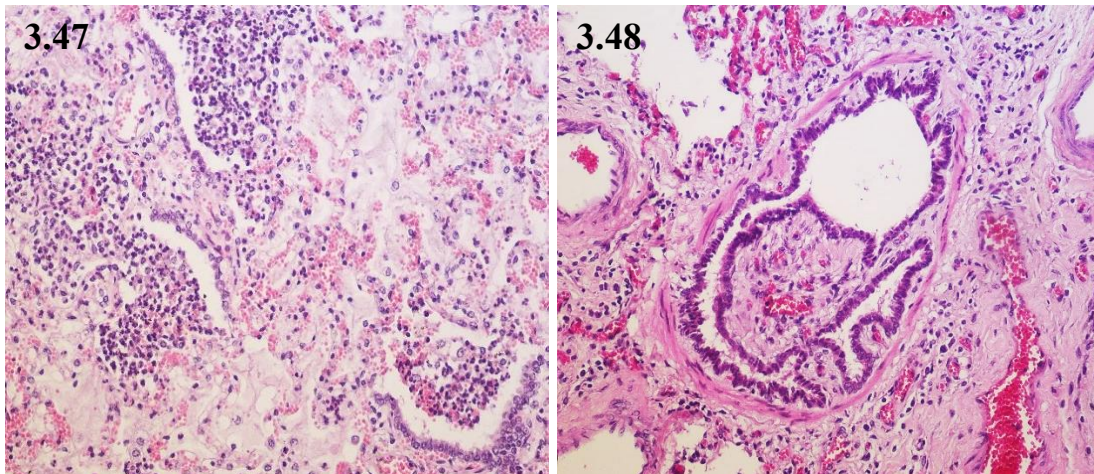
En el 95% (42/44) se observaron lesiones bronquiolares. La tabla 3.3 muestra las frecuencias de lesión bronquiolar y la distribución de la detección de los distintos virus en función del tipo de lesión bronquiolar. La NB fue la categoría más frecuente (55% - 24/44; figura 3. 47) y BO la lesión bronquiolar menos frecuente (7% - 3/44; figura 3. 48). En el grupo OLB las lesiones fueron hiperplasia del BALT (6/6), exudado catarral en luz bronquiolar (2/6) y abundantes eosinófilos en lámina propia de bronquios y bronquiolos (2/6). En 2 animales de la categoría NB se hallaron sincitios epiteliales. Uno de los animales resultó positivo para BRSV (PCR) y BoHV1 (IHQ) y el restante, positivo a BRSV (IHQ).

Todos los pulmones positivos a BRSV, BPIV-3 y BoHV1 (n=12) y 4/5 positivos a BVDV por IHQ o PCR presentaron hiperplasia del BALT. Se identificó necrosis bronquiolar en todos los casos positivos a BPIV-3 (n= 7) y BoHV1 (n= 2) y también en la mayoría (4/6) de los casos positivos a BRSV. Los 2 casos positivos a BRSV en ausencia de NB fueron neumonías intersticiales con bronquiolitis catarral. Uno de ellos, presentó además eosinófilos en la lámina propia de bronquios y bronquiolos.

**Tabla 3.3.** Detección viral en relación con el tipo de lesión bronquiolar en pulmones con lesiones de ERB (n=44).

Virus	Tipo de lesión bronquiolar				
	NB (n=24)	BO (n=3)	NB+BO (n=9)	OLB (n=6)	SLB (n=2)
<b>BRSV*</b> (n=6)	9% (4)	0% (0)	0% (0)	5% (2)	0% (0)
<b>BVDV*</b> (n=5)	5% (2)	2% (1)	0% (0)	2% (1)	2% (1)
<b>BPIV-3*</b> (n=7)	14% (6)	0% (0)	2% (1)	0% (0)	0% (0)
<b>BoHV1*</b> (n=2)	5% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

NB: necrosis bronquiolar, BO: bronquiolitis obliterante, NB+BO: necrosis bronquiolar con bronquiolitis obliterante, OLB: otra lesión bronquiolar, SLB: sin lesión bronquiolar. BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1. \*Casos positivos por IHQ, PCR o a ambas técnicas.



**Figura 3.47.** Necrosis bronquiolar. Se observan 3 bronquiolos con necrosis y atenuación epitelial. En su luz resulta evidente el exudado celular inflamatorio. H&E. Obj. 20x.

**Figura 3.48.** Bronquiolitis obliterante. Destaca la oclusión parcial de la luz bronquiolar dada por la proliferación de tejido conectivo vascularizado, a modo de estructura polipoide, revestido por epitelio bronquiolar. H&E. Obj. 20x.

### **3.7.3 Detección de agentes virales en función del curso de la lesión pulmonar**

En la tabla 3.4 se muestra la distribución de la detección de los agentes virales en relación con el curso de las lesiones pulmonares, independientemente del patrón de lesión microscópica.

Independientemente del curso y tipo de lesión pulmonar, se identificaron secuelas en 21/44 pulmones (48%). Entre estas, se observaron: adherencias pleurales fibrosas, abscesos, fibrosis del parénquima pulmonar con enfisema, bronquiolitis obliterante, fibrosis peribronquiolar y bronquiectasia.

**Tabla 3.4.** Detección viral en función del curso de lesión pulmonar en casos de ERB (n=44).

<b>Virus</b>	<b>Curso de lesión pulmonar</b>		
	<b>AGUDO</b> (n=24)	<b>SUBAGUDO</b> (n=7)	<b>CRÓNICO</b> (n=13)
<b>BRSV*</b> (n=6)	9% (4)	0% (0)	5% (2)
<b>BVDV*</b> (n=5)	7% (3)	0% (0)	5% (2)
<b>BPIV-3*</b> (n=7)	7% (3)	5% (2)	5% (2)
<b>BoHV1*</b> (n=2)	2% (1)	0% (0)	2% (1)

BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1. \*Casos positivos por IHQ, PCR o a ambas técnicas.

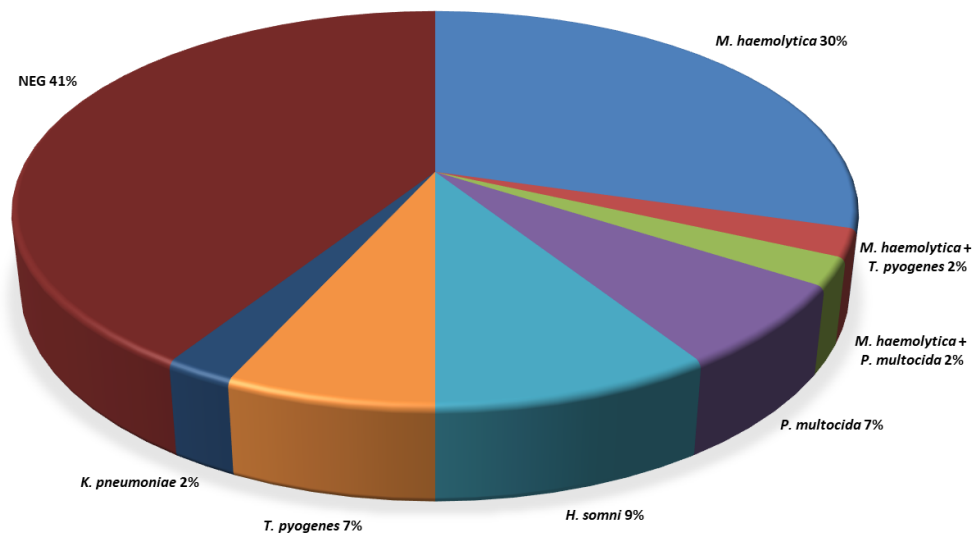
### 3.8 Detección de agentes bacterianos a partir de muestras de pulmón

El anexo 11 muestra el detalle de la detección de agentes bacterianos en cada uno de los animales.

En el 59% de los pulmones (26/44) se aislaron patógenos bacterianos. Las bacterias identificadas se presentan en la figura 3.49. A excepción de *Trueperella pyogenes*, que se identificó en 2/26 casos con patrón de lesión pulmonar NI, el resto de las bacterias aisladas provinieron de pulmones con patrón de lesión BFS y BCN (24/26).

En relación a los animales negativos por bacteriología (n=18), 6 de ellos habían recibido antibioticoterapia en la semana previa a la muerte.





**Figura 3.49.** Detección de agentes bacterianos a partir de muestras de pulmón con lesiones de ERB (n=44).

*M. haemolytica*: *Mannhemia haemolytica*, *H. somni*: *Histophilus somni*, *P. multocida*: *Pasteurella multocida*, *T. pyogenes*: *Trueperella pyogenes*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*. NEG: no identificación de agente bacteriano.

### **3.9 Coinfecciones**

En 11 casos (25%) se detectaron coinfecciones entre virus o entre virus y bacterias involucrados en la ERB. Por otro lado, de los 16 casos en los que se identificaron uno o más agentes virales, 10 de ellos (62%) resultaron positivos en el estudio bacteriológico (Tabla 3.5).

Se identificaron 5 casos de coinfección viral mediante la aplicación de las técnicas de IHQ y/o PCR (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Coinfecciones de agentes virales y bacterianos a partir de muestras de pulmones con lesiones de ERB (n=44).

<b>DETECCIONES<sup>a</sup></b>	<b>% (n de animales)</b>
<b>BRSV+ BVDV</b>	2% (1)
<b>BRSV+ <i>M. haemolytica</i></b>	2% (1)
<b>BRSV+ <i>T. pyogenes</i></b>	2% (1)
<b>BRSV+BPIV-3+ <i>M. haemolytica</i></b>	2% (1)
<b>BRSV+BPIV-3+ <i>T. pyogenes</i></b>	2% (1)
<b>BRSV+BoHV1+ <i>M. haemolytica</i></b>	2% (1)
<b>BPIV-3+ <i>H. somni</i></b>	5% (2)
<b>BPIV-3+ <i>M. haemolytica</i> + <i>P. multocida</i></b>	2% (1)
<b>BPIV-3+ <i>M. haemolytica</i> + <i>T. pyogenes</i></b>	2% (1)
<b>BVDV+ <i>M. haemolytica</i></b>	2% (1)
<b>Sin coinfección<sup>b</sup></b>	48% (21)
<b>Negativos<sup>c</sup></b>	27% (12)
<b>TOTAL</b>	100% (44)

BRSV: virus respiratorio sincitial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfaherpesvirus bovino 1, *M. haemolytica*: *Mannheimia haemolytica*, *H. somni*: *Histophilus somni*, *P. multocida*: *Pasteurella multocida*, *T. pyogenes*: *Trueperella pyogenes*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*. <sup>a</sup>La detección viral se realizó mediante IHQ y/o PCR. La detección bacteriana se estableció mediante cultivo y aislamiento.

<sup>b</sup>Animales con detección de un único agente (virus o bacteria). <sup>c</sup>Animales sin detección de agentes virales y bacterianos.

## 4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se detectaron, a partir de muestras provenientes de animales de EC con lesiones compatibles con ERB, todos los virus que se plantearon como objeto de estudio considerados agentes participantes en el desarrollo de la enfermedad. Los principales resultados se discuten a continuación.

### 4.1 Epidemiología descriptiva e historial de tratamientos de los animales en estudio

La mayor frecuencia de ERB observada en machos (59%) en relación con las hembras (41%) fue similar a lo descrito por otros autores (Cusack y col., 2007; Taylor y col., 2010 y Murray y col., 2017). En los machos, podría considerarse como predisponente, el estrés que genera la maniobra de castración en el ingreso al EC (Taylor y col., 2010), práctica que es muy frecuente en nuestro medio. Sin embargo, estudios realizados sobre los factores de riesgo (Taylor y col., 2010) encontraron que la incidencia de ERB fue mayor en hembras o que no se presentaron diferencias al evaluar la variable sexo. En nuestro caso, también correspondería tener en cuenta que en los EC se incorporan más machos que hembras, dados sus mejores índices productivos (Robert y col., 2009).

La raza influyó en la presentación de ERB ya que uno solo de los bovinos afectados fue cruce *Bos Taurus* x *Bos indicus* y los restantes fueron *Bos taurus* (distintas razas), principalmente Aberdeen angus. En relación a las razas bovinas, las diferencias en la frecuencia de presentación de ERB a favor de animales *Bos taurus* sobre *Bos indicus* concuerda con un trabajo realizado en Australia, con más de 2400 animales en EC, en el que se concluyó que los bovinos *Bos taurus* son

más susceptibles a padecer ERB (Cusack y col., 2007). En igual sentido, tanto la elevada frecuencia de ERB en animales raza Aberdeen angus como la baja frecuencia encontrada en los raza cruza (*Bos taurus* x *Bos indicus*), son hallazgos concordantes con la bibliografía internacional en la que se presentan asociaciones por raza y se propone al vigor híbrido como beneficioso en pos de reducir la incidencia de ERB (Taylor y col., 2010).

En cuanto a los cuadros clínicos de ERB, el 64% de los animales con lesiones pulmonares a la necropsia no fueron detectados en vida con enfermedad clínica. Esta observación se desprende del historial de tratamientos con antibióticos para ERB durante la semana previa a la muerte. Probablemente, esta situación haya sido consecuencia de una deficiente sensibilidad (62%) y especificidad (63%) del método de diagnóstico clínico tradicional para detectar ERB clínica (White and Renter, 2009), aunque también debería considerarse la posibilidad que un porcentaje de estos animales estuvieran cursando ERB subclínicamente. Un estudio reciente, realizado en Irlanda en la misma categoría de animales, demostró mayor detección (45%) de animales con ERB clínica (Murray y col., 2017). Sobre la base del conocimiento que el diagnóstico y tratamiento en los estadios iniciales de enfermedad son los pilares del éxito para la curación (Cusack y col., 2003), la revisión de estrategias y/o protocolos clínicos para la detección de animales con ERB en EC resultan necesarios en nuestro país.

## **4.2 Distribución de la mortalidad**

### **4.2.1 Distribución de la mortalidad en las estaciones del año**

La muerte de animales con lesiones de ERB ocurrió principalmente en otoño (49%) y en invierno (32%). La ERB es una enfermedad estacional en los

EC y varios autores proponen al otoño y al invierno temprano como los momentos de mayor riesgo (Costa y col., 2003; Cusack y col., 2003; Taylor y col., 2010; Cernicchiaro y col., 2012). Se debe prestar especial cuidado en la interpretación de estas observaciones ya que por las características del manejo reproductivo de los bovinos (servicio estacional), es en otoño cuando se produce un importante ingreso de animales con bajo peso, situación que ha sido documentada en EE.UU. (Cusack y col., 2003; Taylor y col., 2010) y que ocurre también en nuestro país. Es así que hemos observado que la mayor incorporación de bovinos en EC de Argentina, en las estaciones mencionadas, redirecciona el trabajo del personal a las tareas de recibimiento y procesamiento (sanidad), lo que lleva a reducir la atención en pos de la detección precoz de animales enfermos de ERB.

#### **4.2.2 Distribución de la mortalidad durante el período de engorde**

La distribución de las muertes en el período de engorde fue similar tanto en los animales con lesiones de ERB que murieron como consecuencia de esta enfermedad como en aquellos que murieron por otras causas.

Tomando como base el total del período de engorde (2-5 meses), en los EC de nuestro país, la ERB evidencia un patrón de incidencia temporal, siendo más frecuente en la fase inicial (<30 días) (Costa y col., 2003). En nuestro estudio, el 75% de los animales muertos que presentaron lesiones de ERB se encontraron dentro de los primeros 35 días de encierre. Esto difiere de un estudio realizado en EC de Oklahoma que demostró una media de muerte de 61,81 días con un desvío estándar de  $\pm 3,18$  días (Fulton y col., 2009). Adicionalmente, autores canadienses han señalado la frecuencia de muerte por ERB tomando como período de evaluación experimental los primeros 60 días de estadía en el EC (Gagea y col.,

2006; Booker y col., 2008). Por otro lado, un reciente estudio en EC de Brasil, expuso una curva de supervivencia con desplazamiento hacia la derecha con respecto a nuestros resultados, indicando que el 50% y el 90% de las muertes de ERB ocurrieron durante los primeros 30 y 105 días respectivamente (Lopes Baptista y col., 2017). Estas diferencias podrían deberse a características de los animales tales como la raza, la edad y el peso al ingreso en el EC, las que son consideradas factores de riesgo para ERB. En este sentido, los animales y los sistemas de EC de Argentina son distintos a los de Brasil. Las razas utilizadas en Brasil son predominantemente *Bos indicus* y en nuestro estudio los animales fueron *Bos taurus*. En relación a la categoría y al peso al ingreso, en Argentina se incorporan al sistema terneros/as con un peso vivo que varía entre 160 y 190 Kg (Costa y col., 2003) mientras que en los EC brasileros, novillos y vaquillonas varían entre 270 y 350 Kg de peso vivo aproximadamente (Costa y col., 2013). Finalmente, estas diferencias en la distribución de los animales muertos con lesiones de ERB a lo largo del período de engorde podrían estar relacionadas con distintas prevalencias y dinámicas de infección de los patógenos involucrados.

### **4.3 Lesiones macroscópicas**

#### **4.3.1 Pulmón**

##### **4.3.1.1 Bronconeumonía (BN)**

El patrón macroscópico de BN fue el más frecuentemente identificado (78%; 57/73), lo que concuerda con Panciera y Confer, 2010 que consideraron a las BN como uno de los dos patrones más importantes de lesión en la ERB.

Casi la totalidad del grupo BN (98%; 56/57) presentó uno o más de los siguientes cambios: focos de necrosis coagulativa, fibrina en tabiques

interlobulillares, pleuritis fibrinosa o exudado purulento en bronquios. Estos hallazgos se interpretaron como compatibles con infección por bacterias de la familia *Pasteurellaceae* (*Mannhemia hemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Mannhemia varigena* y *Biberstenia trehalosi*) siguiendo lo propuesto por Caswell y col., 2012. Macroscópicamente, la distinción entre bronconeumonía fibrinosa y supurativa permitiría suponer, en este último patrón, la participación de *Pasteurella multocida* como principal agente (Pancieria y Confer, 2010). No obstante, esta presunción etiológica se desaconseja debido a que las lesiones de *M. hemolytica*, *H. somni* y *P. multocida* tienden a solaparse en bovinos de EC (Andrews y Kennedy, 1997). Por lo expuesto, al momento de plantear los posibles agentes etiológicos de las bronconeumonías fibrinosa, supurativa o mixta deberían considerarse conjuntamente, todos los patógenos mencionados.

En el 20% (11/57) de los pulmones incluidos dentro del patrón BN se observó focos de necrosis caseosa, que se consideraron compatibles con infección por *Mycoplasma bovis* (Caswell y col., 2012).

Finalmente, abscesos (23%; 13/57) y bronquiectasia (33%; 19/57) se interpretaron compatibles con infección por bacterias oportunistas tales como *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus spp*, entre otras (Caswell y col., 2012).

La participación de agentes virales en el desarrollo de lesiones de BN también se consideró una posibilidad, dada la interacción entre virus, bacterias y micoplasmas ya documentada por otros autores (Hodgson y col., 2005; López y Martinson., 2017).



#### 4.3.1.2 Neumonía intersticial o broncointersticial (NI)

Los animales con lesiones macroscópicas de la categoría NI (18%; 13/73) se interpretaron como casos de neumonía de probable etiología viral (BRSV, BoHV1, BPIV-3 y coronavirus bovino -BCV-). La acción de agentes neumotóxicos, sustancias irritantes, cuadros de hipersensibilidad y sepsis también se evaluaron como posibles causas (Caswell y col., 2012; Caswell y Williams, 2016; López y Martinson., 2017). Este patrón macroscópico fue el segundo en relevancia en nuestro estudio. En un trabajo de revisión de ERB los patrones de lesión pulmonar BN y NI resultaron los más frecuentes y se consideraron principales causales de pérdidas económicas en terneros de EC (Panciera y Confer, 2010).

#### 4.3.1.3 Bronquitis y/o patrón lobulillar de atelectasia (Br)

Ésta fue la condición de menor frecuencia como hallazgo de necropsia (4%; 3/73) y las etiologías consideradas fueron similares a las presentadas para el patrón NI. Sin embargo, aquí se deberían excluir los cuadros de shock séptico y toxemia (Caswell y Williams, 2016).

#### 4.3.1.4 Pleuritis sin lesión pulmonar subyacente (Pl)

La ausencia de individuos bajo esta categoría descartó la posibilidad de pleuritis por *Histophilus somni* (forma septicémica) descrita por otros autores (Caswell y col., 2012; Caswell y Williams, 2016). Es de destacar, que otras posibles causas de esta lesión, como reticulopericarditis traumática y carbunco sintomático -mancha- (Caswell y Williams, 2016) no se incluyeron en este estudio.

## **4.4 Lesiones microscópicas**

### **4.4.1 Pulmón**

Dos consideraciones resultan desafiantes al momento de discutir lesiones microscópicas de neumonías en bovinos. Por un lado la clasificación de estas lesiones no presenta acuerdo internacional (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008; Fulton y col., 2009; Panciera y Confer, 2010 ; Murray y col., 2017) y por otro lado, los diseños de los estudios observacionales realizados por distintos investigadores son diferentes entre sí por lo que se debe ser cuidadoso al momento de realizar comparaciones.

#### **4.4.1.1 Bronconeumonía fibrinosupurativa (BFS)**

La BFS fue el patrón de lesión más frecuente (77%), tal como ha sido descrito para bovinos de esta categoría (Murray y col., 2017) y sistema productivo (EC) (Gagea y col., 2006; Fulton y col., 2009). Nuestros valores fueron similares a los de Fulton y col., 2009 (78%) pero algo más altos que los obtenidos por Gagea y col., 2006 (59%). Estas similitudes y diferencias entre estudios podrían explicarse teniendo en cuenta que el menor porcentaje de BN presentado por Gagea y col, 2006 corresponde a la evaluación de solo los primeros 60 días de engorde; mientras que los valores más altos obtenidos por nosotros y Fulton y col, 2009 incluyen el relevamiento en todo el período de engorde.

Sobre la base de las lesiones observadas en este grupo se establecieron diferentes presunciones etiológicas, siguiendo lo propuesto por Gagea y col., 2006; Caswell y col., 2012 y Caswell y Williams, 2016. En todos los casos (56/56) las lesiones resultaron compatibles con infección por bacterias de la

familia *Pasteurellaceae*. Particularmente, la identificación de focos de necrosis coagulativa y/o leucocitos degenerados (“células en grano de avena”) se consideraron típicos de la infección por *Mannheimia haemolytica* y/o por *Histophilus somni* (42/56). Además, en algunos animales (10/56), se observaron lesiones concomitantes compatibles con bacterias tanto de la familia *Pasteurellaceae* como con *Mycoplasma bovis*, por presentar BFS con focos de necrosis caseosa y bronquiectasia.

El desarrollo de estas lesiones, compatibles con la participación de más de un género bacteriano y/o micoplasmas, pudo haber sido favorecida por una infección viral previa (Pancieria y Confer, 2010). Dos evidencias fundamentales avalan la posibilidad de infección con virus neumotrópicos (BRSV, BPIV-3, BoHV1 y BCV) como son la NB con o sin BO, observada en el 96% (54/56) de los animales de este grupo, y la presencia de sincitios epiteliales (9%; 5/56) (Gagea y col., 2006). Sin embargo, estos dos hallazgos no deberían interpretarse linealmente ya que podrían llevar a sobrestimar o subestimar la compatibilidad con agentes virales. En este sentido, vale la pena recordar que la NB puede también ocurrir como consecuencia del daño mediado por los neutrófilos presentes en las BN, (Caswell y Williams, 2016) o por acción de agentes neumotóxicos (Sorden y col., 2000). Por otro lado, la nula o escasa detección de sincitios epiteliales, como en nuestro caso, no debería llevar a desestimar la participación viral en el desarrollo de las lesiones de ERB, ya que por ejemplo, para el caso de BRSV los sincitios desaparecen luego de los 8 días post infección conforme los antígenos virales son removidos (Caswell y Williams, 2016). Complementariamente, la cantidad y la ubicación de los sincitios epiteliales pueden variar en relación al virus involucrado. Para el caso de BoHV1 y BPIV-3

los sincitios tienden a ser escasos y de ubicación alveolar, mientras que para BRSV son más numerosos y preferentemente bronquiolares (Caswell y Williams, 2016; Sacco y col., 2014). Concluimos así que la presencia de sincitios alveolares y bronquiolares, aunque escasos, son indicativos de la posible participación de más de uno de estos virus en el grupo BFS.

Los CI son típicos de los estadios iniciales de las lesiones virales y muchas veces son escasos o incostantes para BRSV, BPIV-3 y BoHV1 (Pidone y col., 1999; Nandi y col., 2009; Ellis, 2010; Sacco y col., 2014) lo que podría explicar su ausencia en los casos de BFS, que en su mayoría resultaron de curso subagudo y crónico (64%; 36/56).

Finalmente en 14 animales (25%; 14/56) se observó BO que se interpretó como secuela de daño bronquiolar severo previo (7-10 días previos) sobre la base de lo propuesto por Sorden y col., 2000. Suponiendo que la lesión activa ocurrió tiempo atrás, las posibles causas de BO son variadas e incluyen: acción viral, lesión mediada por neutrófilos en neumonías bacterianas, neumotóxicos y/o parásitos (Sorden y col., 2000 y Caswell y Williams, 2016).

#### 4.4.1.2 Bronconeumonía caseonecrótica (BCN)

El 1% de los casos correspondió a esta categoría y al igual que lo mencionado previamente, la presencia de focos de necrosis caseosa se consideró altamente sugestiva de la infección por *Mycoplasma bovis* según lo descrito por otros autores (Gagea y col., 2006; Caswell y col., 2012). De los trabajos relevados, solo uno de los estudios de neumonías en EC incluyó esta categoría de clasificación (Gagea y col., 2006) lo que limita un análisis comparativo. El

estudio referido identificó el 55% de la población con este patrón de lesión y observó frecuencias similares de BFS y BCN.

La diferenciación entre BCN y BFS con focos caseonecróticos, puede parecer hasta arbitraria, en algunos casos. En el presente estudio, aun si sumamos todos los casos de neumonías con focos de necrosis caseosa de los grupos BFS y BCN, el porcentaje observado alcanza solo el 16%; el que se encuentra muy por debajo del 55% mencionado en un estudio canadiense. Sobre esta base, se puede inferir que la incidencia de lesiones sugestivas de infección por *M. bovis* en EC de Argentina es menor que en Canadá (Gagea y col., 2006).

Aunque en este patrón de BCN no se identificaron sincitios epiteliales, la presencia de NB+BO merece las mismas consideraciones que las discutidas para BFS (4.4.1.1).

#### 4.4.1.3 Neumonía intersticial (NI) y broncointersticial (NBI)

Los patrones de NI y NBI son discutidos en su conjunto dadas las similitudes de sus lesiones. Dentro de las posibles causas se incluyen la acción de virus neumotrópicos (BRSV, BPIV-3, BoHV1, BCV), agentes neumotóxicos como el 3-MI (3 metil-indol), condiciones ambientales, cuadros de hipersensibilidad y septicemias o endotoxemias entre otras (Sorden y col., 2000; Doster, 2010; Panciera y Confer, 2010). Por lo tanto resulta difícil, en este patrón de lesión, establecer una asociación etiológica (Caswell y col., 2012 Caswell y Williams, 2016).

La identificación, en dos animales, de NI y de eosinófilos en el intersticio pulmonar (bronquiolar y alveolar), son sugestivas de un proceso de hipersensibilidad o de migraciones larvarias (*Dictyocaulus viviparus* o *Ascaris*

*suum*) como lo mencionan otros autores (Doster, 2010; Caswell y Williams, 2016). En estos animales no se identificaron estructuras parasitarias y por consiguiente, las lesiones descritas podrían haber sido causadas por mecanismos de hipersensibilidad.

Los porcentajes de NI (14%) y NBI (4%) en nuestro estudio fueron mayores que los observados en un trabajo realizado en EC de EE.UU. en el que los autores registraron el 5,1% y el 1,4% para NI y NBI respectivamente (Fulton y col., 2009). Estas diferencias son difíciles de explicar debido a la posible multicausalidad, tanto de NI como de NBI y a las diferencias de criterio existente entre autores al momento de caracterizar las lesiones propias de estos patrones de neumonía. Un ejemplo de esto se desprende de la lectura de un estudio realizado en EC que solo consideró como NI a aquellos pulmones con infiltración de células inflamatorias en el septo alveolar acompañada de membranas hialinas o hiperplasia de neumocitos tipo II (Sorden y col., 2000); mientras que para otros autores, en cambio, el criterio histopatológico de NI no fue especificado (Fulton y col., 2009) o quedó incluido en una misma categoría etiológica junto con otros patrones morfológicos (Gagea y col., 2006).

En los tres animales con NBI, la presencia de NB (con o sin BO) en todos ellos y de sincitios bronquiolares en un caso, fue altamente sugestiva de infección viral no complicada (BRSV, BPIV-3, BoHV1, BCV) siguiendo lo propuesto por otros autores (Pancieria y Confer, 2010; Caswell y col., 2012). En esta categoría, la interpretación de la NB observada resulta más sencilla ya que no puede ser confundida con lesiones mediadas por neutrófilos como ocurre en las bronconeumonías bacterianas. En lo concerniente a la ausencia de CI y a la

presencia de sincitios epiteliales y de BO aplican las mismas consideraciones expuestas en BFS (4.4.1.1).

#### 4.4.1.4 Bronquitis y/o bronquiolitis (BB)

Este patrón de lesión fue uno de las menos frecuentes (4%), similar a lo observado (3%) en un reciente trabajo en terneros post destete de rodeos de cría, tambo y sistemas mixtos (Murray y col., 2017). En EC, Fulton y col., 2009, no evaluaron esta categoría de lesión y solo consideraron las neumonías fatales. Si bien BB es uno de los cuatro patrones morfológicos de enfermedad pulmonar (Caswell y Williams, 2016), se trata de una lesión que no resulta fatal, como lo confirman nuestros resultados en los que los tres animales con BB murieron de salmonelosis, PEM y SPD respectivamente. Aun así, consideramos a BB una lesión importante a tener en cuenta en los estudios de ERB, siendo que en nuestro trabajo la frecuencia de BB fue igual a la de NBI, patrón que la mayoría de los estudios incluyen (Fulton y col., 2009; Panciera y Confer, 2010; Murray y col., 2017).

La asociación etiológica de BB comprende la posibilidad de virus neumotrópicos, bacterias, hipersensibilidad o exposición a irritantes o toxinas (Caswell y Williams, 2016). Las lesiones de NB y BO se interpretaron acorde con lo propuesto para NBI (4.4.1.3). En uno de los casos de BB se observaron eosinófilos en lámina propia de bronquios y bronquiolos, interpretándose de igual modo a lo presentado en NI, para lesión similar.

#### 4.4.1.5 Combinaciones de patrones de lesión pulmonar de ERB

Si bien, al momento de definir cada caso, se ponderó un patrón predominante de lesión pulmonar, el 33% de los animales presentaron más de

uno, lo que ha sido mencionado por Murray y col., 2017. Sin embargo, estos autores no mencionaron ni el tipo ni la frecuencia de combinación de lesiones. En cambio, Gagea y col., 2006, describieron la ocurrencia de combinación de BFS y BCN en el 31% de los casos, resultando el doble de lo identificado en nuestro estudio (15%) para este patrón mixto.

Aunque se acepta que cada patrón de lesión pulmonar por sí mismo puede incluir más de un agente en su desarrollo, la combinación de patrones es otra evidencia más de cómo estos agentes interaccionan entre sí y de la compleja etiopatogenia de la ERB en casos de campo.

#### **4.5 Lesiones macroscópicas y microscópicas en tráquea**

Los casos de traqueítis fibrinonecrótica difusa (5%; 4/73), que se asociaron a la infección por BoHV1 (Caswell y col., 2012), se presentaron con una frecuencia similar (3%) a lo descrito en un estudio de EC de Canadá (Gagea y col., 2006).

#### **4.6 Detección de agentes virales (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1)**

La frecuencia de detección de BRSV (14%), BVDV (11%) y BPIV-3 (16%) a partir de pulmón y, de BoHV1 a partir de pulmón y tráquea (9%), no fueron muy disímiles entre los virus siendo un indicio que todos ellos están circulando de manera similar en animales con lesiones de ERB en EC argentinos.

##### **4.6.1 Detección viral a partir de muestras de pulmón**

BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 se detectaron, mediante IHQ y técnicas moleculares, en muestras de pulmón con lesiones de ERB, lo que constituye



evidencia sólida de la participación de estos virus en el desarrollo de las lesiones de ERB identificadas (Fulton and Confer, 2012).

Los casos que resultaron positivos por IHQ a BRSV, BVDV y BoHV1 presentaron detección de antígenos virales en pulmón de modo similar a lo observado por otros autores (Gagea y col., 2006; Baszler y col., 1995; Booker y col., 2008; Ellis, 2010; Sacco y col., 2014).

Para el caso particular de BRSV estos resultados representan las primeras detecciones por IHQ y PCR en EC de Argentina (Streitenberger y col., 2018; Demarco y col., 2019). A nuestro conocimiento, ésta es además la primera estandarización del anticuerpo policlonal anti-RSV (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para detección de BRSV mediante IHQ en bovinos. Si bien este anticuerpo se utiliza en la detección del virus respiratorio sincitial humano (Larios Mora y col., 2015), no hay antecedentes de su uso en bovinos.

Para el caso de BPIV-3, si bien se han documentado bovinos positivos por AV, IHQ y PCR en Argentina (Bagnis y col., 2006; Maidana y col., 2012), estos estudios no especificaron si se trató de animales de EC, con lo cual los resultados aquí presentados indican la circulación viral en este sistema productivo.

En nuestro estudio, la frecuencia de detección mediante IHQ de antígenos de BRSV y BoHV1 en pulmón resultó menor que la descripta por otros autores en EC (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008). En cambio, para el caso de BVDV fue muy similar a lo ya documentado (Fulton y col., 2009). En relación con BPIV-3, su frecuencia de detección mediante IHQ, fue ampliamente mayor en nuestro estudio en comparación con Booker y col., 2008. Estas diferencias podrían indicar distintos niveles de circulación viral. Sin embargo, algunas consideraciones

merecen ser planteadas. Los trabajos que reflejan diferencias con nuestro estudio en relación a la frecuencia de detección de BRSV, BoHV1 y BPIV-3 usaron anticuerpos primarios distintos a los del presente estudio (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008). Mientras que, en el caso de BVDV, en que se utilizó el mismo anticuerpo que el del estudio de referencia, la detección fue similar (Fulton y col., 2009). Otras variables que pueden haber influido en los niveles de detección son la condición de los animales a partir de los que se obtuvieron las muestras (muertos por ERB vs. animales con lesiones de ERB pero muertos por otras causas) y el período de engorde evaluado (primeros 60 días de engorde vs. todo el período de engorde).

En el caso de la detección viral mediante PCR realizada en nuestro trabajo, se registró el doble de frecuencia de detección de BRSV en comparación a los resultados de Fulton y col., 2009, lo que sugeriría una mayor circulación de este virus en EC de Argentina. No obstante, debe tenerse en cuenta que el citado estudio solo incluyó la detección en animales que murieron a consecuencia de ERB. La imposibilidad para establecer comparaciones con lo realizado por otros autores en estudios de BRSV en EC, está dada en las distintas técnicas por ellos utilizadas (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008).

En relación a la detección, mediante PCR, de BPIV-3 y BoHV1 nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Murray y col., 2017 quienes utilizaron esta técnica en un estudio en terneros con ERB, de categoría similar a los de este trabajo, pero provenientes de distintos sistemas de producción (cría, tambo y mixtos). En el mismo trabajo (Murray y col., 2017), la detección de BVDV fue inferior a lo observado por nosotros. Esta diferencia puede haber estado relacionada al tipo de establecimiento (EC) ya que el movimiento y la

concentración de animales es mayor en EC y hace que resulten más frecuentes las infecciones virales y/o contactos con animales PI (Moore y col., 2015).

La variable combinatoria (IHQ+PCR) usada en este trabajo no ha sido utilizada en estudios previos en EC, en los que se optó por una única técnica diagnóstica para cada virus (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008; Fulton y col., 2009 y Murray y col., 2017). Al comparar los resultados de detección por esta variable combinatoria con los obtenidos por otros autores utilizando solo una técnica (PCR, IHQ o AV), la variable IHQ+PCR resultó en mayor frecuencia de detección para BRSV y BPIV-3 y similar para BoHV1 en pulmones con ERB de EC (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008; Fulton y col., 2009). Para el caso de BVDV la detección por IHQ+PCR (11%) fue mayor a la obtenida por Fulton y col., 2009 mediante IHQ y por Murray y col., 2017 mediante PCR; pero estuvo muy por debajo a lo detectado por otros autores (33%) quienes utilizaron la técnica de AV (Gagea y col., 2006). Esta última técnica podría representar, en la detección de BVDV, una ventaja adicional por la posibilidad de amplificación mediante pasajes celulares. De todos modos, la discrepancia en los porcentajes de detección de BVDV entre nuestro trabajo y el de Gagea y col., 2006 podrían deberse a una real diferencia entre Argentina y Canadá, en la prevalencia de este agente.

Por lo tanto, la detección viral mediante el uso de técnicas en paralelo (IHQ+PCR) fue mayor para todos los virus en estudio, al compararla con el uso de IHQ o PCR como única técnica. Esto era de esperar ya que, al analizar pruebas en paralelo, la sensibilidad de las técnicas diagnósticas se adicionan (Dohoo y col., 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Murray y col., 2017 quienes utilizaron, para la identificación de agentes causales de ERB, tanto cultivo

microbiológico como IHQ y PCR. De esta manera, el uso de la variable combinatoria IHQ+PCR aumentó la frecuencia de detección en los cuatro virus y la convierte en una herramienta diagnóstica interesante para la identificación de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en pulmones con lesiones de ERB en EC.

A lo anteriormente expuesto, se suma otra evidencia que justificaría la realización de IHQ y PCR en cada pulmón con lesiones de ERB y es el prácticamente nulo acuerdo que estas técnicas presentaron en los pulmones analizados. Entre las causas posibles de este resultado podemos mencionar la mayor sensibilidad de la técnica de PCR en relación a IHQ (Caswell y col., 2012; Fulton y Confer, 2012; Deng y col., 2015) y la distribución heterogénea de los antígenos y ácidos nucleicos virales en el parénquima pulmonar (Gagea y col., 2006; Caswell y col., 2012; Deng y col., 2015). Por otro lado, Gagea y col., 2006 encontraron moderada concordancia (índice kappa -proporción de concordancia entre pruebas- de 0,5) entre las técnicas de AV e IHQ utilizadas para detectar BVDV. En el mismo sentido Caswell y col., 2012 mencionan un caso de campo con detección de BRSV, mediante qPCR, mientras que la IHQ e IF resultaron negativas.

#### **4.6.2 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el diagnóstico final**

La detección de los agentes virales estudiados (IHQ+PCR) evidenció diferentes frecuencias entre animales muertos por ERB (n=21) y animales con lesiones de ERB, pero muertos por otra causa (n=23). Este último grupo presentó mayor detección de BRSV, BVDV y BPIV-3 al compararlo con el grupo de animales muertos por ERB. Es de destacar que BVDV solo fue detectado en el

grupo con lesiones de ERB pero muertos por otra causa. Estas mayores detecciones en el grupo de animales con lesiones de ERB, pero muertos por otra causa, podría explicarse considerando que en estos individuos es posible identificar lesiones más tempranas de ERB y por lo tanto es mayor la probabilidad de detección de antígenos y/o ácidos nucleicos virales (Caswell y col., 2012). En este sentido, las lesiones pulmonares de ERB en animales muertos por otra causa fueron de curso agudo y subagudo en un 83% y crónicas en un 17%, mientras que para el caso de muertos por ERB las lesiones fueron agudas y subagudas en un 57% y crónicas en un 43%. Sobre la base de estos resultados consideramos que el monitoreo de virus respiratorios a partir de animales con lesiones pulmonares de ERB, ya sean muertos por esta entidad o por cualquier otra causa, optimizaría su detección en EC.

#### **4.6.3 Detección de BoHV1 a partir de muestras de tráquea**

Afortunadamente, el hecho de haber realizado IHQ para BoHV1 en muestras de tráquea permitió identificar este virus en dos animales que presentaron resultados negativos mediante IHQ o PCR en muestras de pulmón y que se habían clasificado como muertos por ERB sobre la base de las lesiones en tráquea.

Se confirmó entonces que la traqueítis fibrinonecrótica fue producida por BoHV1, lo que ya ha sido reconocido en bovinos de EC y, por lo tanto, debe ser considerada una lesión altamente sugestiva de la infección por este agente (Gagea y col., 2006; López y Martinson., 2017). A pesar de ello, no se identificaron CI intranucleares eosinofílicos típicos de BoHV1 en epitelio traqueal en estos dos animales. Esto era esperable ya que los CI de este agente son hallazgos típicos

solo en los estadios iniciales de lesión e inconstantes en casos de campo (Pidone y col., 1999; López y Martinson., 2017).

La frecuencia de detección de BoHV1, al sumar las detecciones a partir de tráquea y de pulmón, fue del 9% (4/44). Este porcentaje resultó similar a los niveles de detección en EC canadienses (Gagea y col., 2006; Booker y col., 2008) lo que sugiere circulación similar en ambos países.

#### **4.6.4 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el patrón histopatológico de lesión pulmonar**

Los dos patrones de lesión más frecuentes (BFS y NI) presentaron resultados de detección viral muy similares para el caso de BRSV y BVDV. Sin embargo, BPIV-3 y BoHV1 no fueron identificados en NI. Si bien estas dos categorías presentan lesiones morfológicas distintivas, en condiciones de campo se encuentran sumamente relacionadas ya que frecuentemente NI y NBI evolucionan a BFS cuando las lesiones pulmonares se complican con bacterias de la familia *Pasteurellaceae* y/o micoplasmas (Caswell y col., 2012).

En los casos de BFS, principal patrón de lesión pulmonar observado en este ensayo, se detectaron los cuatro virus estudiados resultando evidente la interacción de estos agentes con *Pasteurellaceae* y, muy posiblemente, con micoplasma tal como lo observado por Caswell y col., 2012 y López y Martinson, 2017. Es de destacar la elevada frecuencia de detección de BRSV y BPIV-3 en pulmones con BFS, siendo que estos virus no han sido reportados en lesiones de ERB en EC de Argentina.

En relación con las NI, la participación de BRSV en el 25% de los animales con esta lesión concuerda con lo propuesto por otros autores (Doster,

2010; Panciera y col., 2010). Un trabajo realizado en EC desestimó a BRSV como un agente productor de NI dado que solo el 7% de las NI fueron positivas al virus por IHQ (Sorden y col., 2000). Estas diferencias de detección de BRSV (7% vs 25%) no estarían relacionadas con el curso de la NI ya que en ambos estudios se analizaron lesiones agudas. En cambio, cabe subrayar que la detección de BRSV en los casos de NI de este trabajo se logró únicamente mediante PCR mientras que todos los animales con NI fueron negativos por IHQ.

La etiología de la NI en los restantes animales (75%; 6/8) no pudo confirmarse, pero evidentemente no involucró a los agentes infecciosos que se estudiaron en este ensayo, aun cuando dos animales con NI resultaron positivos a BVDV. En estos animales se desestimó la participación de BVDV en el desarrollo de la neumonía, ya que si bien se lo incluye como uno de los virus predisponentes de ERB en EC (Moore y col., 2015), no se lo ha considerado como agente de NI en bovinos (Sorden y col., 2000; Doster, 2010). En este sentido, según lo propuesto por Sorden y col., 2000 y Doster, 2010 en casos de NI en EC debería también desestimarse la acción de larvas de *Dictyocaulus viviparus* o *Ascaris suum* o la hipersensibilidad a *Saccharopolyspora rectivirgula* y ponderar en cambio, como posibles agentes etiológicos, a algunos neumotóxicos como el 3-MI relacionados a trastornos en la alimentación. Finalmente, en la misma línea, Fulton y col., 2009 no encontraron asociación estadística entre la detección de agentes infecciosos y el patrón NI.

Los animales que presentaron lesiones de BCN, NBI y BB fueron muy escasos. En el único animal con NBI, se detectó BoHV1 y este virus se consideró el agente causal de esta neumonía, en acuerdo con el concepto de etiología viral pura en casos de NBI presentado por otros autores (Panciera y Confer, 2010;

Caswell y col., 2012). En cambio, el hallazgo de BB como única lesión en un solo animal, no pudo ser explicado por la detección de BVDV ya que este virus no es causal de este tipo de lesión (Murray y col., 2017). En este caso en particular se consideró la posibilidad, que no pudo ser confirmada, de un animal PI por BVDV. La falta de detección viral en BCN y las detecciones virales discutidas en NBI y BB deben ser interpretada cuidadosamente ya que estos grupos no quedaron lo suficientemente representados en nuestro estudio como para ponderar o descartar la etiología viral en el desarrollo de estas lesiones.

#### **4.6.5 Detección virales a partir de muestras de pulmón y su relación con las lesiones bronquiolares**

La NB con o sin BO fue el hallazgo más frecuente al analizar las lesiones bronquiolares (75%; 33/44) y la BO uno de los menos frecuentes (7%; 3/44). Contrariamente, Fulton y col., 2009 en un estudio de neumonías fatales observaron NB con o sin BO en un 28% de los pulmones y BO en un 39,7%. Estos resultados demuestran que la inclusión en nuestro estudio de animales con lesiones de ERB muertos por esta entidad y muertos por otras causas permitió identificar más lesiones bronquiolares agudas por sobre las secuelas de lesión bronquiolar (BO). Esto se tradujo en una mayor detección en nuestro ensayo de dos de los virus neumotrópicos evaluados (BRSV y BoHV1) al compararlo con los resultados de Fulton y col., 2009.

En el 40% de los animales con NB (13/33) se detectaron virus neumotrópicos (BRSV, BPIV-3 y BoHV1), que se interpretaron como agentes causales de NB en acuerdo con lo propuesto por otros autores (Pancieria y Confer, 2010; Caswell y col., 2012). Estos resultados señalan la importancia de considerar



a la lesión NB como sugestiva de infección viral en pulmones con ERB en EC. En solo dos de estos mismos casos de NB se identificaron infrecuentes sincitios epiteliales, bronquiolares en un caso y alveolares en el otro. Uno de estos pulmones fue positivo a BRSV y el otro a BRSV y BoHV1. A partir de estos resultados consideramos que, aunque infrecuente, la presencia de sincitios epiteliales es muy orientativa de infección viral. La característica transitoria de los sincitios (7-8 días post infección) en las lesiones de ERB, y por consiguiente la posibilidad de su ausencia, no descarta la participación de virus en estas lesiones (Caswell y col., 2012; Caswell y Williams, 2016).

Las lesiones bronquiolares que se observaron en los pulmones con detección de BVDV no se atribuyeron a la acción de este virus por las razones expuestas en el apartado 4.6.4. Solo un trabajo experimental con BVDV 2 describió el desarrollo de NBI en terneros sugiriendo que la alteración bronquiolar pudo ser de origen viral (Ellis y col., 1998). Sin embargo, un estudio de neumonías en EC no encontró asociación significativa entre NB y la detección de BVDV (Fulton y col., 2009).

En el 60% de los pulmones con NB (20/33) no se detectaron virus. Varias razones pueden explicar estos resultados. Por un lado, las técnicas usadas en nuestro trabajo, si bien son muy específicas, presentan menor sensibilidad si se las compara con otras técnicas moleculares tal como qPCR (Caswell y col., 2012). En segundo lugar, debería tenerse en cuenta la posibilidad de infección por otros virus neumotrópicos, como el caso de BCV que no fueron analizados en el presente estudio (Caswell y Williams, 2016). En tercera instancia, debe considerarse la posibilidad de daño epitelial mediado por neutrófilos en el contexto de neumonías bacterianas (Sorden y col., 2000), concepto que se ha

confirmado estadísticamente en el caso de *M. haemolytica* (Fulton y col., 2009). Por último, agentes neumotóxicos como el 3-MI y 4-ipomeanol podrían también ser la causa de NB (Sorden y col., 2000).

#### **4.6.6 Detección viral a partir de muestras de pulmón y su relación con el curso de lesión pulmonar**

Independientemente del patrón de lesión pulmonar, las lesiones agudas (55%; 24/44) fueron más frecuentes que las crónicas (30%; 13/44) en contraposición a lo observado por Fulton y col., 2009 quienes describieron la ocurrencia de un 21% y 40,2% de lesiones agudas y crónicas respectivamente. En cambio, la frecuencia de lesiones subagudas hallada en nuestro estudio fue similar a lo descrito por el mismo autor (Fulton y col., 2009). La inclusión, por parte de Fulton y col., 2009, de solo casos de neumonías fatales en EC de EE.UU. explica las diferencias encontradas en las categorías agudas y crónicas al compararlas con nuestro estudio.

El curso de lesión pulmonar influyó en la detección de agentes virales a partir de muestras de pulmón. La mayor detección de BRSV, BVDV y BPIV-3 ocurrió en lesiones agudas y/o subagudas por sobre las crónicas lo que concuerda con Gagea y col., 2006. En el caso de BoHV1 la escasez de animales positivos no permitió evaluar el curso de la lesión en relación a la detección viral.

La participación de los agentes virales relacionados con la ERB se la ha relacionado, en mayor medida, con los estadios iniciales del desarrollo de lesiones (Willoughby y col., 2008; Ellis, 2010; Caswell y col., 2012) lo que explica, en muchos casos, los intentos infructuosos de detección a partir de casos fatales de ERB. Por esta razón, algunos autores cuestionan la representatividad de los

resultados obtenidos relacionados con la evaluación de lesiones y/o la detección de agentes iniciadores de lesión cuando se parte de casos fatales (Taylor y col., 2010). En contraposición, la serología e hisopados nasales si bien son muy buenas herramientas para evaluar agentes primarios fallan en predecir los agentes secundarios que complican las lesiones de ERB (Fulton y col., 2009). Nuestro diseño de trabajo presentó una situación intermedia entre el estudio de neumonías fatales y los ensayos con animales vivos (serología e hisopados nasales) lo que resultó beneficioso en pos de aumentar las posibilidades de detección de agentes primarios de lesión (virus) en las etapas agudas, sin dejar de evaluar los agentes secundarios.

#### **4.7 Prevalencia de agentes bacterianos a partir de muestras de pulmón**

En el 59% de los animales (26/44) se logró el aislamiento bacteriológico, siendo *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* las bacterias más frecuentes, lo que evidencia la participación de estos microorganismos en el desarrollo de bronconeumonías bovinas. En correspondencia, los tres agentes mencionados junto con *M. bovis*, han sido considerados los microorganismos de mayor importancia en pulmones con lesión de ERB (Andrews, 1997; Grissett y col., 2015). *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* son habitantes normales del aparato respiratorio superior (Grissett y col., 2015) y por tanto pueden ser aislados a partir de hisopados nasales o nasofaríngeos de animales sanos. Por esta razón, nuestros aislamientos bacterianos realizados a partir de muestras de pulmón con lesiones de ERB confirman su participación en la etiopatogenia de las lesiones, tal como lo describen otros autores (Griffin y col., 2010). En este sentido, y de acuerdo con lo observado por Murray y col., 2017, las mencionadas bacterias favorecieron el desarrollo de lesiones de bronconeumonía caracterizadas por

pleuritis fibrinosa, áreas de necrosis coagulativa, trombosis linfática o de vasos sanguíneos, presencia de leucocitos degenerados y, en menor medida, vasculitis.

De todos los casos con aislamiento bacteriano positivo, la bacteria más frecuentemente identificada fue *M. haemolytica* (58% - 15/26) resultado concordante con autores que la consideran el patógeno bacteriano más importante de ERB (Griffin y col., 2010; Murray y col., 2017).

Al comparar los porcentajes de detección de *M. haemolytica* (34%), *P. multocida* (9%) e *H. somni* (9%) obtenidos en nuestro trabajo mediante aislamiento bacteriológico con los de Murray y col., 2017 utilizando este único método, los resultados fueron similares para el caso de *P. multocida*. En cambio, en nuestro ensayo los porcentajes de detección de *M. haemolytica* e *H. somni* fueron mucho mayores, más aún si se tiene en cuenta que este último agente no fue aislado en el mencionado trabajo. Sin embargo, Murray y col. 2017 no solo utilizaron aislamiento bacteriológico, sino que sumaron en paralelo otros métodos (IHQ y PCR) para la detección de las bacterias mencionadas. Por lo que, en la comparación final de los resultados, nuestros niveles de detección estuvieron muy por debajo de los logrados en el trabajo de referencia. Esta comparación sugiere que nuestros índices podrían estar subvalorando la prevalencia real de las bacterias involucradas en ERB en este ensayo. Los mismos autores (Murray y col., 2017) demostraron que la técnica de IHQ en el caso de *M. haemolytica* e *H. somni* y la de PCR en el caso de *M. haemolytica*, *P. multocida* e *H. somni* fueron mucho más sensibles que el aislamiento microbiológico, por lo que deberían ser tenidas en cuenta en futuros estudios de neumonías en EC de Argentina.

En dos animales se aisló únicamente *T. pyogenes* a partir de NI. El rol de esta bacteria como agente de lesión fue desestimado. En un contexto similar en el que *T. pyogenes* se identificó sin bronconeumonía severa acompañante, Härtel y col., 2004 la consideraron un patógeno incidental o contaminante de la muestra.

*T. pyogenes* y *K. pneumoniae* se aislaron en dos animales con BFS crónica. Estas infecciones suelen presentarse en muchas oportunidades asociadas a neumonías crónicas, dada su capacidad de infectar tejidos necróticos en animales que sobreviven a los estadios iniciales de ERB (Griffin y col., 2010).

El aislamiento bacteriológico resultó negativo en el 41% de los animales (18/44) lo que merece al menos tres consideraciones. En 6/18 animales no sería esperable identificar agentes bacterianos ya que presentaban NI. Soporta esto lo publicado por Fulton y col., 2009 quienes encontraron correlación positiva entre NI y la ausencia de detección de agentes bacterianos de ERB. En los restantes animales negativos (12/18) dos situaciones pueden haber afectado la detección bacteriana como son, la menor sensibilidad de la técnica (aislamiento microbiológico) al compararla con técnicas moleculares e IHQ (Pancieria y Confer 2010; Murray y col., 2017) y el hecho que 6 animales hubieran recibido antibioticoterapia durante los 7 días previos a la muerte.

Finalmente, 16% animales (7/44) presentaron lesiones altamente sugestivas de infección por *M. bovis* las que desafortunadamente no pudieron ser confirmadas. Es de destacar que Murray y col., 2017, en todas las bronconeumonías con focos caseonecróticos, identificaron *M. bovis* tanto por IHQ como mediante PCR. En el mismo sentido, Gagea y col., 2006 consideran a las lesiones caseonecróticas pulmonares como relacionadas con la infección por *M.*

*bovis* sin importar si se logra o no la identificación de este agente. Es de destacar que *M. bovis* ha sido identificado y considerado emergente en EC de varios países (Gagea y col., 2006; Fulton y col., 2009) y recientemente, en bovinos de EC de Argentina (Margineda y col., 2017). Estudios posteriores son necesarios en nuestro país para determinar la prevalencia de *M. bovis* y su interacción con otros agentes de ERB.

#### **4.8 Coinfecciones**

En el 25% (11/44) de los pulmones con lesiones de ERB, se logró identificar más de uno de los agentes infecciosos estudiados. Estos resultados son difíciles de comparar con otros estudios realizados, por diferentes motivos. Por un lado, como ya se mencionó en otros apartados, al cambiar el criterio de inclusión (pulmones provenientes de neumonías fatales vs. pulmones con y sin lesión de neumonía vs. pulmones con lesión macroscópica -fatales y no fatales- de neumonía) es esperable cambios en la aparición y composición de las coinfecciones. Lo mismo ocurrirá según varíe la categoría de animales evaluados, los agentes infecciosos que se investiguen y las diferentes técnicas diagnósticas que se utilicen.

En el 62% de los animales (10/16), en los que se identificó uno o más de los virus analizados, se aisló al menos una bacteria involucrada en la ERB. Esto es esperable y concuerda con otros autores que han observado que los virus interactúan, anteceden o se presentan conjuntamente con agentes bacterianos (Hodgson y col., 2005; Cusack y col., 2007; López y Martinson., 2017). La mayoría de las interacciones virales-bacterianas involucraron a la bacteria *M. haemolytica* y a uno o más de los virus estudiados (BRSV, BDVD, BPIV-3,

BoHV1). Estos virus incrementan la susceptibilidad a la infección por *M. haemolytica* (Leite y col., 2002) ya que generan un ambiente favorable para la colonización y replicación de bacterias en el pulmón (Pancieria y Confer, 2010). Por un lado, alteran las superficies mucosas (erosión o necrosis de epitelios), de manera que la adhesión bacteriana en células infectadas por virus se ve facilitada (Leite y col., 2002; Panciera y Confer, 2010). Por otro lado, la inmunidad innata y adaptativa también resultan alteradas negativamente por la acción viral, ya que los virus modifican la función de los macrófagos alveolares y la liberación de mediadores de la inflamación además de producir supresión de la proliferación y apoptosis de linfocitos (Pidone y col., 1999; Leite y col., 2002; Ackermann y col., 2010; Ridpath, 2010; Panciera y Confer, 2010; Albayrak y col., 2019).

Por último, un pulmón con ERB presentó coinfección exclusivamente viral por BRSV y BVDV. Entre estos dos agentes se ha documentado la existencia de sinergismo que incrementa la diseminación de ambos virus (Ridpath, 2010). Resultados *in vitro*, demostraron mayor depresión de la función de los macrófagos alveolares cuando este tipo celular fue coinfectado con ambos virus (Liu y col., 1999). El hallazgo de esta coinfección viral refuerza el concepto de sinergismo entre estos dos virus y lleva a reconsiderar su papel en casos de campo.

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ La detección de los virus BRSV, BPIV-3, BoHV1 y BVDV en pulmones de animales de EC con lesiones compatibles con ERB, mediante IHQ y PCR confirmó la asociación entre la presencia viral y el desarrollo de lesión.

- ✓ Las lesiones pulmonares de ERB identificadas a la necropsia se observaron principalmente en otoño e invierno y durante los primeros 35 días de encierre.
- ✓ Las categorías BFS (bronconeumonía fibrinosupurativa) y NI (neumonía intersticial) fueron los patrones de lesión más frecuentemente hallados en los casos de ERB en EC.
- ✓ Las frecuencias de detección de BRSV (14%), BVDV (11%) y BPIV-3 (16%) a partir de pulmón y de BoHV1 a partir de pulmón y tráquea (9%) no fueron disímiles entre ellos lo que indica niveles de similar circulación en animales con lesiones de ERB en EC argentinos.
- ✓ El anticuerpo policlonal anti-RSV (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) resultó adecuado para la detección mediante IHQ de BRSV.
- ✓ El uso de IHQ y PCR en paralelo, en muestras de pulmón de animales con lesiones de ERB mejoraron la capacidad de detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1.
- ✓ La mayor frecuencia de detección de los virus estudiados se obtuvo en pulmones con patrón de lesión BFS y NI, de curso agudo y con necrosis bronquiolar.
- ✓ *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* fueron los agentes bacterianos más frecuentes identificados por cultivo y aislamiento microbiológico.
- ✓ En el 16% de los animales estudiados se identificaron, lesiones sugestivas de infección por *Mycoplasma bovis*.
- ✓ El 23% de los animales con lesiones de ERB presentaron coinfecciones viral y bacteriana.



## CONCLUSIONES GENERALES

1. La detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 en bovinos de EC con signos clínicos y lesiones de ERB confirmó la participación de estos agentes en el desarrollo de la enfermedad.
2. Para el caso particular de BRSV estos resultados representan las primeras detecciones por IHQ y PCR en EC de Argentina (Streitenberger y col., 2018; Demarco y col., 2019).
3. Los signos clínicos y las lesiones de ERB se identificaron durante los primeros 23 y 35 días de encierre, respectivamente.
4. En animales con ERB clínica, la realización de técnicas moleculares a partir de hisopados nasales, de fluido de BAL y del sobrenadante del cultivo de estas muestras maximizó la capacidad de detección viral.
5. El alto porcentaje de seroconversión obtenido para BRSV, BVDV 1a, BVDV 1b, BVDV 2, BPIV-3 y BoHV1 demuestra su gran circulación en EC.
6. Las seroconversiones para BRSV, BVDV 1a, BVDV 2 y BPIV-3, indicativas de infección viral activa, fueron significativamente más altas en animales con títulos bajos al ingreso del EC.
7. Las seroconversiones para los distintos genotipos de BVDV y BRSV resultaron significativamente altas o, con mayor tendencia, durante el primer mes en el EC; mientras que para BPIV-3 y BoHV1 no se determinó predilección temporal.
8. La detección de los virus estudiados a partir de hisopados nasales confirmó de manera directa su presencia en las poblaciones durante los primeros 30 días en el EC (infecciones subclínicas).

9. La detección de cepas de BVDV 1b lleva a considerar la revisión de las estrategias de diagnóstico y de vacunación.
10. Las frecuencias de detección de BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1 a partir de muestras de pulmón y/o tráquea con lesiones de ERB fueron equivalentes, lo que indica niveles similares de circulación de estos virus.
11. El uso de IHQ y PCR en paralelo en pulmones con lesiones de ERB mejoró la capacidad de detección de todos los virus.
12. La mayor frecuencia de identificación de agentes virales en el pulmón se obtuvo en los casos de BFS y NI, de curso agudo y con necrosis bronquiolar.
13. Las infecciones virales múltiples fueron frecuentes en los estudios longitudinales, así como las coinfecciones virales y bacterianas en los animales con lesiones de ERB lo que sugiere interacción de sinergismo entre los agentes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann MR, Derscheid R, Roth JA. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26:215-228. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.03.001.
2. Albayrak H, Yazici Z, Ozan E, Tamer C, El Wahed AA, Wehner S, Ulrich K, and Weidmann M. Characterisation of the First Bovine Parainfluenza Virus 3 Isolate Detected in Cattle in Turkey. *Vet. Sci.* 2019; 6: 56. doi: 10.3390/vetsci6020056.
3. Allen JW, Viel L, Bateman KG, Nagy E, Røsendal S, Shewen PE. 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.* 1992; 56: 281–288. PMID: 1335831.
4. Amrine DE, McLellan JG, White BJ, Larson RL, Renter DG, Sanderson M. Evaluation of three classification models to predict risk class of cattle cohorts developing bovine respiratory disease within the first 14 days on feed using on-arrival and / or pre-arrival information. *Comput. Electron. Agr.* 2019. 156: 439–446. doi: 10.1016/j.compag.2018.11.035.
5. Andrews GA, Kennedy GA. Respiratory diagnostic pathology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1997; 3: 515-547. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30312-1.

6. Antuña JC, Rossanigo C. Escenario Internacional y análisis de la actividad ganadera bovina Nacional por estratos de productores y composición del stock Años 2008 a 2011. Stock ganadero 2011. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <http://rian.inta.gov.ar/ganaderia/Pais-2011.pdf>.
7. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, Rikula U, Pentikäinen J, Huovilainen A, Rusanen H, Soveri T, Sihvonon L, Pelkonen S. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet. Microbiol.* 2007; 119: 256–265. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.001.
8. Avra TD, Abell KM, Shane DD, Theurer ME, Larson RL, White BJ. A retrospective analysis of risk factors associated with bovine respiratory disease treatment failure in feedlot cattle. *Anim. Sci.* 2017; 95:1521-1527. doi: 10.2527/jas.2016.1254.
9. Babcock AH, Renter DG, White BJ, Dubnicka SR, Scott HM. Temporal distributions of respiratory disease events within cohorts of feedlot cattle and associations with cattle health and performance indices. *Prev. Vet. Med.* 2010; 97: 198–219. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.09.003.
10. Babcock AH, White BJ, Renter DG, Dubnicka SR, Scott HM. Predicting cumulative risk of bovine respiratory disease complex (BRDC) using feedlot arrival data and daily morbidity and mortality counts. *Can. J. Vet. Res.* 2013; 77: 33–44. PMID: 23814354.
11. Bagnis G, Giraud J, Sutil S, Torres C, Martin V, Raviolo J, Savoretti C, Sabini L. Aislamiento y detección antigénica del Virus Sincitial Respiratorio Bovino en la Argentina. *Rev Med Vet.* 1999; 80: 173–177.

12. Bagnis G, Rabaglino MB, Raviolo JM, Schleef N. Estudio histopatológico, etiológico e inmunohistoquímico de lesiones compatibles con neumonías intersticiales en el ganado bovino. *Rev. Med. Vet.* 2006; 7: 1-7.
13. Bagnis G. Infecciones virales respiratorias producidas por el virus sincicial respiratorio bovino (BRSV) y el virus parainfluenza 3 bovino (BPI3). *Sitio argentino de Producción animal* 2000; 4.  
[http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciones/bovinos\\_en\\_general/13-infecciones\\_virales\\_respiratorias\\_por%20virus.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_en_general/13-infecciones_virales_respiratorias_por%20virus.pdf).
14. Baker JA, York CJ, Gillepsie JH, Mitchell GB. Virus diarrhea in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1954; 15: 525-531. PMID: 13207572.
15. Baszler TV, Evermann JF, Kaylor PS, Byington TC, Dilbeck PM. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 1995; 32: 609–618. doi: 10.1177/030098589503200601.
16. Bolin SR, Ridpath JF. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56: 755-759. PMID: 7653884.
17. Booker CW, Guichon PT, Jim GK, Schunicht OC, Harland RJ, Morley PS. Seroepidemiology of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *Can. Vet. J.* 1999; 40: 40-48. PMID: 9919366.
18. Booker CW, Abutarbush SM, Morley PS, Jim GK, Pittman TJ, Schunicht OC, Perrett T, Wildman BK, Fenton RK, Guichon PT, Janzen ED. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of

feedlot cattle in western Canada. *Can. Vet. J.* 2008; 49: 473–481. PMID: PMC2359492.

19. Booker CW, Perrett T, Fenton RK, Behlke EJ, Hannon SJ, Wildman BK, Rademacher RD, McMullen CA, Hunsaker BD, Hill T, Jim GK. An Evaluation of Concomitant Therapy for the Treatment of Arrival Fever in Feedlot Calves at Ultra-High Risk of Developing Undifferentiated Fever / Bovine Respiratory Disease. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2017; 15: 85–98. PMID: 18512457.

20. Brodersen BW. Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26: 323-33. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.010.

21. Caldow G, Geraghty T, Mason C, Carty H, Wilson D. Bovine herpesvirus 1 infection in cattle: a discussion on vaccination and control. *Livestock.* 2018; 23: 3. <https://www.magonlinelibrary.com/doi/pdf/10.12968/live.2018.23.3.110>

22. Campbell JR. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. *Vet. Clin. Food Anim.* 2004; 20: 39–50. doi: 10.1016/j.cvfa. 2003.11.003.

23. Caswell JL, Hewson J, Slavić Đ, DeLay J, Bateman K. Laboratory and postmortem diagnosis of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 2012; 28:419-441. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.07.004.

24. Caswell JL, Williams KJ. Respiratory Sistem. En: Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6th. Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, Ed Maxie MG, 2016, vol 2, p. 465-591.

25. Cernicchiaro N, Renter DG, White BJ, Babcock AH, Fox JT. Associations Between Weather Conditions During the First 45 Days After Feedlot Arrival and

Daily Respiratory Disease Risks in Autumn-Placed Feeder Cattle in the United States. *J. Anim. Sci.* 2012; 90: 1328-37. doi: 10.2527/jas.2011-4657.

26. Chamorro MF, Walz PH, Haines DM, Passler T, Earleywine T, Palomares RA, Riddell KP, Galik P, Zhang Y, Givens MD. Comparison of levels and duration of detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus 1, bovine viral diarrhea virus 2, bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza virus 3 in calves fed maternal colostrum or a colostrum-replacement product. *Can. J. Vet. Res.* 2014; 78: 81–88. PMID: 24688168.

27. Chen X, Wangb X, Qi Y, Wen X, Li C, Liu X, Ni H. Meta-analysis of prevalence of bovine herpes virus 1 in cattle in Mainland China. *Acta Trop.* 2018; 187: 37–43. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.07.024.

28. Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart AV, Wosiacki SR, Médici KC, Alfieri AA. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods.* 2005; 128:183-188. PMID: 15939490.

29. Collins JK, Teegarden RM, MacVean DW, Salman, Smith GH, Frank GR. Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 49: 1316-1319. PMID: 3178027.

30. Cooper VL, Brodersen BW. Respiratory Disease Diagnostics of Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26: 409-416. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.009.

31. Costa EF, Giuliadori MJ, Dezillio M, Romero JR. Mortalidad en un feedlot de La Plata (Buenos Aires, Argentina): causas, distribución mensual e impacto económico. *Analecta Vet.* 2003; 23: 13-19.
32. Costa Jr CC, Goulart RS, Albertini TZ, Feigl BJ, Cerri CEP, Vasconcelos JT, Bernoux M, Lanna DPD, Cerri CC. Brazilian Beef Cattle Feedlot Manure Management: A Country Survey. *J. Anim. Sci.* 2013; 91: 1811-1818. doi: 10.2527/jas.2012-5603.
33. Cusack PMV, McMeniman N, Lean I J. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust. Vet. J.* 2003; 81: 480–487. doi: 10.1111/j.1751-0813.2003.tb13367.x.
34. Cusack PM, McMeniman N, Lean IJ. Feedlot entry characteristics and climate: Their relationship with cattle growth rate, bovine respiratory disease and mortality. *Aust. Vet. J.* 2007; 85: 311–316. doi: 10.1111/j.1751-0813.2007.00184.x.
35. Dana GD. Establecimientos de engorde a corral 2008-2013. Actualización a diciembre de 2013. Informe estadístico N° 20, SENASA. Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales Dirección Nacional de Sanidad Animal. 2013. Servicio Nacional de sanidad y calidad agroalimentaria. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/11.1\\_2013-2008\\_0.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/11.1_2013-2008_0.pdf).
36. Dedonder KD. Lung auscultation as a predictor of lung lesions and bovine respiratory disease outcome in feedyard cattle. Tesis de maestría. Kansas State University. 2008.
37. Deng M, Ji S, Fei W, Raza S, He C, Chen Y, Chen H, Guo A. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in Four



Bovine Species in China. *PLoS One*. 2015; 10: 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0121718.

38. Demarco R, Quiroga MA, Fazzio LE, Abraham G, Gilead T, Negrelli PM, Rearte R, Streitenberger, N. Enfermedad respiratoria bovina: estudio anatomopatológico y detección de virus respiratorio sincitial bovino por inmunohistoquímica. XII Jornadas y reunión anual AAIV, 2019, La Plata, Argentina.

39. Dohoo IR, Martin SW, Stryhn H. Screening and diagnostic tests. En: *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd. Edition, Prince Edward Island, Canada: AVC Inc, 2003, p. 92-127.

40. Domingues HG, Spilki FR, Arns CW. Detecção molecular e análise filogenética de vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em swabs e tecido pulmonar de bovinos adultos. *Pesqui. Vet. Brasil*. 2011; 31: 961–966. doi: 10.1590/S0100-736X2011001100004.

41. Dong Xm, Zhu Ym, Cai H, Lv C, Gao Y, Yu Z, Xue F. Studies on the pathogenesis of a Chinese strain of bovine parainfluenza virus type 3 infection in Balb/c mice. *Vet. Microbiol*. 2012; 158: 199–204. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.012.

42. Doster AR. Bovine Atypical Interstitial Pneumonia. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract*. 2010; 26: 395–407. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.03.002.

43. Durham PJK, Hassard LE. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can. Vet. J*; 1990. 31: 815–820. PMID: 17423704.

44. Eberhart NL. Utilizing Behavioral Monitoring to Detect Sickness or Injury in Dairy Cow and Calves. Masters Theses. University of Tennessee. 2016. [https://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5157&context=utk\\_gradtheses](https://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5157&context=utk_gradtheses)
45. Edwards TA. Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 2010; 26: 273–284. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.03.005.
46. Ellis JA. Update on viral pathogenesis in BRD. *Anim. Health. Res. Rev.* 2009; 10: 149–153. doi: 10.1017/S146625230999020X.
47. Ellis JA. Bovine Parainfluenza-3 Virus. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 2010; 26: 575–593. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.08.002.
48. Ellis JA, West KH, Cortese VS, Myers SL, Carman S, Martin KM, Haines DM. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus-type II. *Can. J. Vet. Res.* 1998; 62: 161–169. PMID: 9684044.
49. Fajt VR, Apley MD, Roth JA, Frank DE, Brogden KA, Skogerboe TL, Shostrom VK, Y-L Chin YL. The Effects of Danofloxacin and Tilmicosin on Neutrophil Function and Lung Consolidation in Beef Heifer Calves With Induced *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* Pneumonia. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2003; 26: 173-179. doi: 10.1046/j.1365-2885.2003.00477.x.
50. Fazzio LE, Landoni M. Estudio comparativo de la eficacia de oxitetraciclina a la dosis de 40 mg/kg y tilmicosina, combinadas con meloxicam, en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feedlot. *Analecta Vet.* 2009; 29:2024. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11226/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11226/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

51. Fazzio LE, Mattioli GA, Costa EF, Picco SJ, Rosa DE, Testa JA, Gimeno EJ. Renal cortex copper concentration in acute copper poisoning in calves. *Pesq. Vet. Bras.* 2012; 32: 1-4. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000100001>
52. Fazzio LE, Giuliadori MJ, Galván WR, Streitenberger N, Landoni MF. A metaphylactic treatment with double dose oxytetracycline reduces the risk of bovine respiratory disease in feedlot calves. *Rev. Vet.* 2015; 26: 89-92. <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/213>
53. Ferella A, Pérez Aguirreburualde MS, Margineda C, Aznar N, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej M. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in feedlot cattle from Córdoba and Santa Fe, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2018; 50: 275–279. doi: 10.1016/j.ram.2017.07.004.
54. Ferella A, Perez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Parreño V, Dus Santos MJ, Mozgovej M. Dynamics of Neutralizing Antibodies Against Bovine Respiratory Syncytial Virus in a Dairy Herd From Santa Fe Province, Argentina. *Rev Argent. Microbiol.* 2020; 11. doi: 10.1016/j.ram.2020.04.003.
55. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can. J. Vet. Res.* 2000; 64: 151–159. PMID: 10935880.
56. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* 2002; 66: 181–190. PMID: 12146890.

57. Fulton RW, Cook BJ, Step DL, Confer AW, Saliki JT, Payton ME, Burge LJ, Welsh RD, Shawn Blood K. Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *Can. J. Vet. Res.* 2002; 66: 173–180. PMID: 12146889.
58. Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Siliki JT, Burge LJ, Payton ME. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: Impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals.* 2003; 31: 89–95. doi: 10.1016/S1045-1056(03)00021-6.
59. Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, Burge LJ, Duff GC. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea 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.* 2004; 22: 643–649. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.08.033.
60. Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV 1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet. Microbiol.* 2005; 111: 35–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.002.
61. Fulton RW, Hessman B, Johnson BJ, Ridpath JF, Saliki JT, Burge LJ, Sjeklocha D, Confer AW, Funk RA, Payton ME. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J. Am. Vet. Med. A.* 2006; 228: 578–584. doi: 10.2460/javma.228.4.578.

62. Fulton RW, Shawn Blood K, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009; 21: 464–477. doi: 10.1177/104063870902100407.
63. Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, Ridpath JF, Kapil S, Burge LJ, Cook BJ, Confer AW. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can. J. V. Res.* 2009; 73:283–291. PMID: 20046630.
64. Fulton RW, Confer AW. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist? *Can. Vet. J.* 2012; 53:754-761. doi: 10.1177/104063870902100407.
65. Gaeta NC, Mendonça Ribeiro BL, Reyes Alemán MA, Matsumiya Thomazelli L, Durigon EL, de Campos Nogueira AH, de Stefano E, Okuda LH, Pituco EM, Gregory L. Evaluation of bovine Parainfluenza type-3 virus and Influenza virus D participation in bovine respiratory disease of calves from Brazilian family farming. *Med. Vet. (UFRPE)*. 2018; 11: 227-232. <http://www.ead.codai.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/1947/482482568>.
66. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. Diseases and Pathogens Associated With Mortality in Ontario Beef Feedlots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; 18:18-28. doi: 10.1177/104063870601800104.

67. Galvan WR, Arriaga GJ, Streitenberger N, Landoni MF, Fazzio LE. Efecto del tratamiento con florfenicol en el control de la enfermedad respiratoria bovina en engorde a corral. *Rev. Med. Vet.* 2019; 100: 80 - 84. <https://scholar.google.com.ar/citations?user=5DPnsAQAAAAJ&hl=es>
68. Giraud JA, Magnano G. Principales enfermedades que aparecen en los sistemas de engorde a corral en la región. XXVII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias, 2008, Resumen p. 51-55, Villa Giardino, Córdoba, Argentina.
69. Goswami P, Banga HS, Mahajan V, Singh ND, Deshmukh S, Brar RS. Detection of Multiple Antibodies and Risk Factor Association of Common Respiratory Viruses in the State of Punjab, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017; 6: 567-577. [https://www.academia.edu/32879005/Detection\\_of\\_Multiple\\_Antibodies\\_and\\_Risk\\_Factor\\_Association\\_of\\_Common\\_Respiratory\\_Viruses\\_in\\_the\\_State\\_of\\_Punjab\\_India](https://www.academia.edu/32879005/Detection_of_Multiple_Antibodies_and_Risk_Factor_Association_of_Common_Respiratory_Viruses_in_the_State_of_Punjab_India)
70. Graham DA, McShane J, Mawhinney KA, McLaren IE, Adair BM, Merza M. Evaluation of a single dilution ELISA system for detection of seroconversion to bovine viral diarrhoea virus, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus: comparison with testing by virus neutralization and hemagglutination inhibition. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 48: 43-48. doi: 10.1177/104063879801000108.
71. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26: 381-394. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.004.

72. Grissett GD, White BJ, Larson RL. Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex. *J. Vet. Intern. Med.* 2015; 29: 770–780. doi: 10.1111/jvim.12597. doi: 10.1111/jvim.12597.
73. Grooms DL, Brock KV, Bolin SR, Grotelueschen DM, Cortese VS. Effect of constant exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus on morbidity and mortality rates and performance of feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. A.* 2014; 244: 212–224. doi: 10.2460/javma.244.2.212.
74. Hägglund S, Svensson C, Emanuelson U, Valarcher JF, Alenius S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet. J.* 2006; 172: 320–328. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.04.029.
75. Haines DM, Clark EG, Chelack BJ. The Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Formalin Fixed Bovine Lung with Commercially Available Monoclonal Antibodies and Avidin Biotin Complex Immunohistochemistry. *Can. J. Vet. Res.* 1989; 53: 366-368. PMID: 2766160.
76. Hanzlicek GA, White BJ, Renter DG, Blasi D. A field study evaluating health, performance, and behavior differences in crossbred beef calves administered different vaccine-parasiticide product combinations. *Vaccine.* 2010; 28: 5998–6005. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.096.
77. Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Aho R, Soveri T, Saloniemi H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta. Vet. Scand.* 2004; 45:193-200. doi: 10.1186/1751-0147-45-193.
78. Headley SA, Okano W, Balbo LC, Marcasso RA, Oliveira TE, Alfieri AF, Negri Filho LC, Michelazzo MZ, Rodrigues SC, Baptista AL, Saut JPE, Alfieri

- AA. Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2018; 30: 249–251. doi: 10.1177/1040638717739945.
79. Hessman BE, Sjeklocha DB, Fulton RW, Ridpath JF, Johnson BJ, McElroy DR. Acute bovine viral diarrhea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24: 397–404. doi: 10.1177/1040638711436244.
80. Hodgson PD, Aich P, Manuja A, Hokamp K, Roche FM, Brinkman FSL, Potter A, Babiuk LA, Griebel PJ. Effect of Stress on Viral–Bacterial Synergy in Bovine Respiratory Disease: Novel Mechanisms to Regulate Inflammation. *Comp. Funct. Genomics.* 2005; 6: 244–250. doi: 10.1002/cfg.474.
81. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim. Health. Res. Rev.* 2007; 8:187-205. doi: 10.1017/S146625230700134X.
82. Jones C, Chowdhury S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26: 303–321. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.007.
83. Klem TB, Rimstad E, Stokstad M. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. *BMC. Vet. Res.* 2014; 10:15. doi: 10.1186/1746-6148-10-15.
84. Larsen LE, Tjørnehøj K, Viuff B, Jensen NE, Uttenthal A. Diagnosis of Enzootic Pneumonia in Danish Cattle: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Naturally



and Experimentally Infected Cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 416-422. doi: 10.1177/104063879901100505.

85. Larson RL. Bovine Viral Diarrhea Virus-Associated Disease in Feedlot Cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 2015; 31: 367–380. doi: 10.1016/j.cvfa.2015.05.007.

86. Leite F, Sylte MJ, O'Brien S, Schultz R, Peek S, van Reeth K, Czuprynski CJ. Effect of Experimental Infection of Cattle With Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) on the Ex Vivo Interaction of Bovine Leukocytes With *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica* Leukotoxin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 84: 97-110. doi: 10.1016/s0165-2427(01)00397-x.

87. Larios Mora A, Detalle L, Van Geelen A, Davis MS, Stohr T, Gallup JM, Ackermann MR. Kinetics of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Memphis Strain 37 (M37) Infection in the Respiratory Tract of Newborn Lambs as an RSV Infection Model for Human Infants. *PLoS One.* 2015; 10(12):e0143580. doi: 10.1371/journal.pone.0143580. eCollection 2015.

88. Liu L, Lehmkuhl HD, Kaeberle ML. Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. *Can. J. Vet. Res.* 1999; 63: 41-48.

89. Lopes Baptista A, Rezende AL, Fonseca PA, Massi RP, Nogueira GM, Magalhães LQ, Headley SA, Menezes GL, Alfieri AA, Saut JPE. Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from southeastern Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2017; 11: 791-799. doi: 10.3855/jidc.9296.

90. López A, Martinson SA. Respiratory System, Mediastinum and Pleurae. En: Zachary JF and Mc Gavin MD. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6th. Edition, Elsevier Mosby, St. Louis, USA, 2017; p. 471-560.
91. Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas individuales. En: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, 2003, p. 3-422.
92. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's Veterinary Virology. 4th. Edition, Elsevier, London, UK, 2011; p. 179-201.
93. MAGyP, 2017. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Series de Stock bovino y mapas 2017, Fuente: Elaborado por la Dirección de Producción Ganadera – DNPG. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion\\_interes/informes/\\_archivos//000001=Series%20de%20stock%20bovino%20y%20mapas/000000\\_Mapas/000000\\_Ganado%20bovino.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion_interes/informes/_archivos//000001=Series%20de%20stock%20bovino%20y%20mapas/000000_Mapas/000000_Ganado%20bovino.pdf).
94. MAGyP, 2018. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Informe faena 2018, Fuente: Elaborado por la Dirección de Producción Ganadera – DNPG. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion\\_interes/informes/\\_archivos//000005=Faena%20y%20producci%C3%B3n%20de%20carne%20bovina/000001\\_Informe%20MENSUAL%20de%20faena%20bovina.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion_interes/informes/_archivos//000005=Faena%20y%20producci%C3%B3n%20de%20carne%20bovina/000001_Informe%20MENSUAL%20de%20faena%20bovina.pdf).
95. Maidana SS, Lomonaco PM, Combessies G, Craig MI, Diodati J, Rodriguez D, Parreño V, Zabal O, Konrad JL, Crudelli G, Mauroy A, Thiry E, Romera SA. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. BMC Vet. Res; 2012 8: 83. doi: 10.1186/1746-6148-8-83.

96. Maidana SS, Ferrufino C, Romera SA. Desarrollo de un ELISA indirecto para cuantificar anticuerpos bovinos contra Parainfluenza virus 3. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales*. 2013; 11: 81-92.
97. Margineda CA, Zielinski GO, Jurado S, Ferrella A, Mozgovej M, Alcaraz AC, López A. Mycoplasma bovis pneumonia in feedlot cattle and dairy calves in Argentina. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2017; 10: 79-86. doi: 10.24070/bjvp.1983-0246.v10i2p79-86.
98. Martin SW, Bohac JG. 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.* 1986; 50: 351–358. PMID: 3017529.
99. Martin SW, Bateman KG, Shewen PE, Rosendal S, Bohac JE. 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.* 1989; 53: 355–362. PMID: 2766158.
100. Martin SW, Bateman KG, Shewen PE, Rosendal S, Bohac JE, Thorburn M. A Group Level Analysis of the Associations Between Antibodies to Seven Putative Pathogens and Respiratory Disease and Weight Gain in Ontario Feedlot Calves. *Can. J. Vet. Res.* 1990; 54: 337–342. PMID: 2165846.
101. Martin SW, Nagy É, Armstrong D, Rosendal S. The associations of viral and mycoplasmal antibody titers with respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can. Vet. J.* 1999; 40: 560-570. PMID: 12001336.
102. Mitra N, Cernicchiaro N, Torres S, Li F, Hause BM. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in

feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *J. Gen. Virol.* 2016; 97: 1771-1784. doi: 10.1099/jgv.0.000492. Epub 2016 May 5.

103. Moore SJ, O'Dea MA, Perkins N, O'Hara AJ. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015; 27: 6–17. doi: 10.1177/1040638714559741.

104. Murray GM, More SJ, Sammin D, Casey MJ, McElroy MC, O'Neill RG, Byrne WJ, Earley B, Clegg TA, Ball H, Bell CJ, Cassidy JP. Pathogens, Patterns of Pneumonia, and Epidemiologic Risk Factors Associated With Respiratory Disease in Recently Weaned Cattle in Ireland. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017; 29:20-34. doi: 10.1177/1040638716674757.

105. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 2007; 38: 181-209. doi: 10.1051/vetres:2006059.

106. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim. Health. Res. Rev.* 2009; 1: 85-98. doi: 10.1017/S1466252309990028.

107. Newcomer BW, Neill JD, Galik PK, Riddell KP, Zhang Y, Passler T, Velayudhan BT, Walz PH. Serologic Survey for Antibodies Against Three Genotypes of Bovine Parainfluenza 3 Virus in Unvaccinated Ungulates in Alabama. *Am. J. Vet. Res.* 2017; 78: 239-243. doi: 10.2460/ajvr.78.2.239.

108. Noffsinger T, Lukasiewicz K, Hyder L. Feedlot Processing and Arrival Cattle Management. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 2015; 31: 323–340. doi: 10.1016/j.cvfa.2015.06.002.

109. Odeón AC, Späth EJA, Paloma EJ, Leunda MR, Fernández Sainz IJ, Pérez SE, Kaiser GG, Draghi MG, Cetrás BM, Cano A. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev. Med. Vet.* 2001; 82: 216-220. [https://www.researchgate.net/publication/242279322\\_Seroprevalencia\\_de\\_la\\_Diarrea\\_Viral\\_Bovina\\_Herpesvirus\\_Bovino\\_y\\_Virus\\_Sincicial\\_Respiratorio\\_en\\_Argentina](https://www.researchgate.net/publication/242279322_Seroprevalencia_de_la_Diarrea_Viral_Bovina_Herpesvirus_Bovino_y_Virus_Sincicial_Respiratorio_en_Argentina)

110. OIE 3.4.7. Bovine viral diarrhoea. In: OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th. Edition. World Organization for Animal Health, Paris, France, 2018, chapter 3.4.7. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf)

111. OIE 3.4.11. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th. Edition. World Organization for Animal Health, Paris, France, 2018, chapter 3.4.11.

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.11\\_IBR\\_IPV.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf)

112. O'Neill R, Mooney J, Connaghan E, Furphy C1, Graham DA. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a

retrospective study. *Vet. Rec.* 2014; 175: 351. doi: 10.1136/vr.102574. Epub 2014 Jul 18.

113. Pacheco JM, Lager I. Indirect method ELISA for the detection of antibodies against bovine diarrhea virus in bovine serum. *Rev. Argent. Microbiol.* 2003; 35: 19-23. PMID: 12833676.

114. Paller T, Hostnik P, Pogačnik M, Toplak I. The prevalence of ten pathogens detected by a real-time PCR method in nasal swab samples collected from live cattle with respiratory disease. *Slov. Vet. Res.* 2017; 54: 101 -107. <https://www.slovetres.si/index.php/SVR/article/view/202/70>.

115. Panciera RJ, Confer AW. Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26: 191–214. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.001.

116. Parreño V, Romera SA, Makek L, Rodriguez D, Malacari D, Maidana S, Compaired D, Combessies G, Vena MM, Garaicoechea L, Wigdorovitz A, Marangunich L, Fernandez F. 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.* 2010; 169:143-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.014.

117. Parreño V, 2018. Fundamentos y manejo de vacunas para la prevención de las diarreas y enfermedades respiratorias en terneros. XLVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, 2018, Resumen, p.1-11, Paysandú, Uruguay.

118. Pecora A, Malacari DA, Ridpath JF, Perez Aguirreburualde MS, Combessies G, Odeón AC, Romera SA, Golemba MD, Wigdorovitz A. Research in Veterinary

Science First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96: 204–212. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.004.

119. Pecora A, Perez Aguirreburualde MS, Ridpath JF, Dus Santos MJ. Molecular Characterization of Pestiviruses in Fetal Bovine Sera Originating From Argentina: Evidence of Circulation of HoBi-Like Viruses. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:359. doi: 10.3389/fvets.2019.00359.

120. Pérez Aguirreburualde MS. Desarrollo y evaluación de herramientas biotecnológicas innovadoras para el control del virus de la Diarrea Viral Bovina en la provincia de Chubut. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 2014.

121. Philippe-Reversat C, Homer D, Hamers C, Brunet S, Huñady M. Duration of immunity of a four-valent vaccine against bovine respiratory diseases. *Acta Vet. Brno.* 2017; 33: 325–332. doi: 10.2754/avb201786040325.

122. Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray ME. Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Vet.* 1999; 19: 40–50. [https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/3958/11746\\_3958.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/3958/11746_3958.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

123. Posado R, Bartolomé D, san Miguel JM, García JJ. Rinotraqueitis infecciosa bovina y virus respiratorio sincitial bovino en ganado de Lidia en Salamanca. *Journal Article Archivos de Zootecnia.* 2013; 62: 181-190. <http://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v62n238/art3.pdf>.

124. Quintero Barbosa J, Corredor Figueroa AP, Salas SS, Camargo H, Sánchez A, Tobón J, Ortiz D, Schachtebeck E, Gutierrez MF. High prevalence of persistently infected animals from bovine viral diarrhoea in Colombian cattle. *BMC Vet. Res.* 2019; 15: 1–8. doi: 10.1186/s12917-018-1769-5.

125. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Disease associated with viruses and Chlamydia. En: *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th. Ed., Ed Mc Grow- Hill, 2007; p. 1336-1361.
126. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Subcommittee on Standardization of Immunohistochemistry. Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20: 393-413. doi: 10.1177/104063870802000401.
127. Raviolo JM, Bagnis J, Aguilar JA, Giraud GC, Zielinski JE. Raviolo, C.W. Arns, F.R. Spilki. Immunocytochemical characterization of the cytopathic effect induced by bovine respiratory syncytial virus strain RC 98 on Hep-2 cells. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2009; 61(4) : 980-985.
128. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* 1938; 439-497. <https://academic.oup.com/aje/articleabstract/27/3/493/99616?redirectedFrom=fulltext>.
129. Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1959; 135:147-52. PMID: 13672870.
130. Ridpath JF, Fulton RW, Kirkland PD, Neill JD. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated



from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010; 22: 184–191. doi: 10.1177/104063871002200203.

131. Ridpath, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhea viruses to bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010. 26: 335–348. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.003.

132. Ridpath JF, Lovell G, Neill JD, Hairgrove TB, Velayudhan B, Mock R. Change in predominance of Bovine viral diarrhea virus subgenotypes among samples submitted to a diagnostic laboratory over a 20-year time span. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011; 193: 185–193. doi: 10.1177/104063871102300201.

133. Robert S, Santangelo F, Albornoz I, Dana G. Estructura del feedlot en Argentina-Nivel de asociación entre la producción bovina a corral y los titulares de faena. IPCVA. 2009, Buenos Aires, Argentina. <http://www.ipcva.com.ar/files/Trabajo%20integracion%20feedlot.pdf>.

134. Romera SA, Hilgers LA, Puntel M, Zamorano PI, Alcon VL, Dus Santos MJ, Blanco Viera J, Borca MV, Sadir AM. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine.* 2000; 19: 132-141. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00104-3.

135. Rossanigo CE, Bengoelea A, Sager RL. Enfermedades bovinas en sistemas intensivos de la región semiárida-subhúmeda central. Comunicación. *Revista Argentina de Producción Animal.* 2009; 28: 303-334. <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/rapa/article/view/3510/3301>.

136. Sacco RE, McGill JL, Pillatzki AE, Palmer MV, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet. Pathol.* 2014; 51:427-436. doi: 10.1177/0300985813501341.

137. Salem E, Hägglund S, Cassard H, Corre T, Näslund K, Foret C, Gauthier D, Pinard A, Delverdier M, Zohari S, Valarcher J, Ducatez M, Meyer G. Pathogenesis, Host Innate Immune Response, and Aerosol Transmission of Influenza D Virus in Cattle. *J. Virol.* 2019; 93 (7). doi: 10.1128/JVI.01853-18.
138. Samal SK, Pastey MK, McPhillips TH, Mohanty SB. Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein expressed in insect cells specifically interacts with the phosphoprotein and the M2 protein. *Virology.* 1993; 193:470-473. doi: 10.1006/viro.1993.1148.
139. Sanderson MW, Dargatz DA, Wagner BA. Risk factors for initial respiratory disease in United States' feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. *Can. Vet. J.* 2008; 49: 373–378. PMID: 18481546.
140. Sarmiento-Silva RE, Nakamura-Lopez Y, Vaughan G. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Viruses.* 2012; 4: 3452–3467. doi: 10.3390/v4123452.
141. SAS. SAS and STAT User's Guide, Release 9.4. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2003.
142. SENASA, 2006. Resoluciones 216/2006 y 351/06 disponibles en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1029&io=4627> y <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1029&io=9818> .
143. Schaefer AL, Cook NJ, Church JS, Basarab J, Perry B, Miller C, Tong AK. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res. Vet. Sci.* 2007; 83: 376–384. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.01.008.

144. Schneider MJ, Tait RG Jr., Busby WD, Reecy JM. An evaluation of bovine respiratory disease complex in feedlot cattle: Impact on performance and carcass traits using treatment records and lung lesion scores. *J. Anim. Sci.* 2009; 87: 1821–1827. doi: 10.2527/jas.2008-1283.
145. Schudel AA. Biotecnología en la caracterización, patogenia y prevención de la encefalitis bovina a BVH-1. Tomo XLII N°4. Premio Wilfrid Barón, 1987. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.
146. Solís-Calderón JJ, Segura-Correa JC, Aguilar-Romero F, Segura-Correa VM. Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 2007; 82:102-110. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.05.013.
147. Sorden SD, Kerr RW; Janzen ED. Interstitial pneumonia in feedlot cattle: Concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12: 510–517. doi: 10.1177/104063870001200604.
148. Streitenberger N, Ferella A, Pérez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovej MV, Maidana S, Romera SA, Pecora A, Quiroga MA, Fazio LE. Complejo respiratorio bovino: evidencia de circulación viral múltiple en un establecimiento de cría. *RIA.* 2017; 43; 2: 149-155. <http://ria.inta.gob.ar/sites/default/files/trabajosenprensa/streitenberger-castellano-4.pdf>
149. Streitenberger N, Ferella A, Mozgovej M, Dus Santos MJ, Pérez Aguirreburualde MS, Gonzalez F, Fazio LE, Demarco R, Quiroga, MA. Primera detección de virus respiratorio sincicial bovino en bovinos de engorde a corral en

Argentina. XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria y XII Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina, 2018, resumen p. 80, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

150. Systat. Sigmaplot User’s Guide, version 10.0. Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA, 2006.

151. Taylor LF, Van Donkersgoed J, Dubovi EJ, Harland RJ, van den Hurk JV, Ribble CS, Janzen ED. The prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in a population of feedlot calves in western Canada. *Can. J. Vet. Res.* 1995; 59: 87-93. PMC1263744.

152. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures? *Can. Vet. J.* 2010; 51: 1351–1359. PMID: 21358927

153. Timsit E, Workentine M, Schryvers AB, Holman DB, van der Meer F, Alexander TW. Evolution of the nasopharyngeal microbiota of beef cattle from weaning to 40 days after arrival at a feedlot. *Vet. Microbiol.* 2016; 1: 75-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.020.

154. Tomlinson MS, Hopker A, Corbishley A. 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.* 2017; 5:e000402. doi:10.1136/vetreccr-2016-000402. [https://www.research.ed.ac.uk/portal/files/33197700/Final\\_Submission\\_IBR\\_outbreak.pdf](https://www.research.ed.ac.uk/portal/files/33197700/Final_Submission_IBR_outbreak.pdf)

155. USDA (United States Department of Agriculture). 2011. Feedlot 2011: Part IV: Health and health management on U.S. feedlots with a capacity of 1000 or

more head. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Centers for Epidemiology and Animal Health, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO. [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot2011/Feed11\\_dr\\_PartIV\\_1.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/feedlot/downloads/feedlot2011/Feed11_dr_PartIV_1.pdf).

156. Valarcher JF, Bourhy H, Gelfi J, Schelcher F. Evaluation of a Nested Reverse Transcription-PCR Assay Based on the Nucleoprotein Gene for Diagnosis of Spontaneous and Experimental Bovine Respiratory Syncytial Virus Infections. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1858–1862. PMID: 10325337.

157. Valarcher JF, Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38: 153-180. DOI: 10.1051/vetres:2006053.

158. Vilcek S, Elvander M, Ballagi-Pordány A, Belák S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2225-2231. PMID: 7814551.

159. Vilcek S. Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses. *Vet. Med. (Praha).* 1994; 39: 687-700. PMID: 7817501.

160. Wagner RT. Assessment of on-arrival vaccination and deworming on health and growth performance in high risk stocker cattle. Masters Theses. Mississippi State University. 2018. [http://sun.library.msstate.edu/ETD-db/theses/available/etd-10212018\\_091315/unrestricted/PQFINAL.pdf](http://sun.library.msstate.edu/ETD-db/theses/available/etd-10212018_091315/unrestricted/PQFINAL.pdf).

161. West K, Bogdan J, Hamel A, Nayar G, Morley PS, Haines DM, Ellis JA. A Comparison of Diagnostic Methods for the Detection of Bovine Respiratory

Syncytial Virus in Experimental Clinical Specimens. *Can. J. Vet. Res.* 1998; 62: 245–250. PMID: 9798088.

162. White BJ, Renter DG. 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.* 2009; 21:446-453. doi: 10.1177/104063870902100405.

163. Willoughby K, Thomson K, Maley M, Gilray J, Scholes S, Howie F, Caldow G, Nettleton PF. Development of a Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for the Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Clinical Samples and Its Comparison With Immunohistochemistry and Immunofluorescence Antibody Testing. *Vet. Microbiol.* 2008; 126: 264-270. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.005.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Titulación y ajuste de la dilución de trabajo del virus de parainfluenza 3 bovino (BPIV-3) por hemaglutinación.**

- 1- Descongelar una alícuota de BPIV-3.
- 2- Cargar 50  $\mu$ l de PBS 1X en las tres primeras filas de una placa de 96 pocillos fondo en U. Se utilizan las filas A y B para realizar la dilución del virus por duplicado mientras que la fila C se destina para control de glóbulos rojos.
- 3- Agregar 50  $\mu$ l de virus de trabajo en los primeros pocillos 1 a 6 de las filas A y B (dilución 1/2).
- 4- Realizar diluciones seriadas en base 2 a partir de 1/2 hasta 1/64 transfiriendo 50  $\mu$ l desde los pocillos 1 hasta el 6.
- 5- Agregar 50  $\mu$ l de la dilución 1/120 de glóbulos rojos en todos los pocillos.
- 6- Incubar a temperatura ambiente (20-27 °C) durante 1 hora. Una vez que se visualiza la formación de botón de glóbulos rojos en la fila 3 de la placa (control de glóbulos rojos) se puede proceder a la lectura.
- 7- El título del virus se considera como la inversa de la dilución máxima en la cual se observa hemaglutinación (sin formación de botón de glóbulos rojos) y se expresa en unidades de hemaglutinación (UHA) en 50  $\mu$ l.
- 8- El virus debe tener un título de 16 UHA en 50  $\mu$ l, lo que equivale a la solución de trabajo del virus (8 UHA/25  $\mu$ l). Si el título obtenido es menor, dicha suspensión de virus no es apta para el ensayo. Si el título viral es mayor, se deberá realizar una dilución en PBS 1X para ajustar. Por ejemplo, si el título es 64

UHA/50 ul para el ajuste, realizar el cociente  $64/16=4$ , entonces se deberá preparar una dilución  $1/4$  de la alícuota del virus. Se recomienda efectuar esta dilución en dos etapas, una primera dilución  $1/2$ , retitular y, de ser necesario, realizar una segunda dilución  $1/2$  para llegar a  $1/4$  y retitular.



**Anexo 2. Preparación de la dilución de glóbulos rojos (GR) para la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA).**

1- Extraer 2 ml de sangre de la vena safena de un cobayo con aguja y jeringa estéril lentamente para evitar hemólisis.

2- Desacoplar la aguja y colocar la sangre en un tubo cónico de 15 ml estéril con 2 ml de anticoagulante (citrato o Alsever 1X).

3- Centrifugar a 1500 rpm en rotor 70Ti (Beckman Coulter), a 4 °C durante 5 min.

4- Eliminar la fase líquida con una pipeta automática/tip de 1000 µl.

5- Lavar los glóbulos rojos. Resuspender el paquete de glóbulos rojos en PBS 1X y llevar a un volumen de 15 ml. Centrifugar durante 10 min a 1800 rpm en rotor 70Ti (Beckman Coulter), a 4 °C. El sobrenadante debe ser límpido, la presencia de un tinte rojizo es indicador de hemólisis y en ese caso los GR no son aptos para la utilización en el ensayo. Descartar el sobrenadante.

6- Repetir el paso 5.

7- Diluir los GR. Realizar una primera dilución 1/4 (1 ml de paquete de GR más 3 ml de PBS 1X). Posteriormente, se realiza una dilución 1/30 (1 ml de la dilución 1/4 más 29 ml de PBS 1X). De este modo se obtiene una dilución final de trabajo de 1/120 o 0,8 %.

Nota: la suspensión de GR debe prepararse fresca en el momento de la realización del ensayo. De no ser posible, se puede almacenar a 4 °C durante 24 h.

**Anexo 3. Preparación se soluciones necesarias para realizar ELISA indirecto de alfaherpesvirus bovino 1 (BoHV1).**

Buffer carbonato/bicarbonato (buffer de pegado), PH 9,6 (tolerancia en pH: 0,03):

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>----- 0,159 g

NaHCO<sub>3</sub>----- 0,293 g

Agua destilada c.s.p.----- 100 ml

Notas: ajustar pH con NaOH/ HCl (1 N). Almacenar a 4° C (1-8° C)

Buffer de bloqueo y diluyente. PBS/Tween/OVA 1 % pH 7,4:

Tween20----- 500µl

PBS 1X----- 1000 ml

Ovoalbúmina----- 10 g

Buffer de Lavado (PBS 1X Tween 0,1 %):

PBS----- 1000 ml

Tween20----- 1 ml

Solución Madre de ABTS:

ABTS (2-2'-azino-bis 3-etilbentiazolina-6-sulfónico)----- 0,22 g

Buffer Ácido Cítrico----- 10 ml

Notas:

Fraccionar en alícuotas de 1 ml en tubos plásticos tipo Eppendorf de 1,5 ml y almacenar a -20 °C.

Las alícuotas se pueden descongelar y congelar varias veces. Siempre preparar volúmenes pequeños de solución madre de ABTS (no más de 20 ml). La solución debe presentar una tonalidad verde pálido, en caso de presentar un color verde muy fuerte esta debe descartarse.

Manipular la droga con guantes, barbijo y antiparras. El ABTS es un cromógeno higroscópico y que se oxida fácilmente. Por lo tanto, no introducir en el frasco de la droga, ningún elemento especialmente de material metálico (como espátulas). Pesar la cantidad de polvo necesaria volcando la droga directamente desde el frasco a un contenedor plástico apropiado (bandeja de pesada, vaso de precipitados). Cerrar el frasco, cubrir la tapa con Parafilm® y mantener a temperatura ambiente y lejos de la luz.

Solución de uso ABTS:

Solución madre ABTS----- 300 µl

*Buffer* Ácido Cítrico----- 10 ml

Peróxido de hidrógeno 30 Vol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)----- 10 ml

Nota: preparar en el momento de uso solo la cantidad necesaria y descartar el remanente.

*Buffer* Ácido cítrico pH 5,0 (tolerancia en pH: 0,03):

Ácido Cítrico Monohidrato----- 0,960 g

Agua destilada c.s.p.----- 100 ml

Nota: ajustar el PH con NaOH 1N o HCl 1N (aproximadamente 10 ml) para llevar a pH 5,0 ± 0,5. Almacenar a 4 °C (1-8 °C).

SDS (dodecil/laurel sulfato de sodio) al 5% en agua:

Almacenar a temperatura ambiente, ya que las soluciones de SDS se congelan a temperatura de 4° C o menores.

**Anexo 4. Cebadores utilizados para la detección de BoHV1 y 5, BPIV-3, BVDV y BRSV mediante la técnica de PCR.**

Virus	Primer	[con]	Secuencia nucleotídica 5'- 3'	Producto (bp)	Referencia
<b>BOHV1 y 5<sup>1</sup></b>	B1 (F)	1 µg/µl	CAACCGAGACGGAAAGCTCC	354 pb (BoHV1) 159 pb (BoHV5)	Claus y col., 2005
	B5 (F)	1 µg/µl	CGGACGAGACGCCCTTGG		
	BCON (R)	1 µg/µl	AGTGCACGTACAGCGGCTCG		
<b>BPIV-3</b>	Mfwd (F)	1 mM	AGTGATCTAGATGATGATCCA	328 bp	Maidana y col., 2012
	Mrev (R)	1 mM	GTTATTGATCCAATTGCTGT		
<b>BVDV</b>	325 (F)	100 ng/µl	GAGGCTAGCCATGCCCTTAGT	297 pb	Vilcek y col., 1994
	326 (R)	100 ng/µl	TCAACTCCATGTGCCATGTACAGCA		
<b>BRSV<sup>2</sup></b>	B1 (F)	1 µg/µl	AATCAACATGCAGTGCAGTTAG	711 pb	Vilcek y col., 1994
	B2A (R)	1 µg/µl	TTTGGTCATTCGTTATAGGCAT		
	B3 (F)	1 µg/µl	GTGCAGTTAGTAGAGGTTATCTTAGT	481 pb	Vilcek y col., 1994
	B4A (R)	1 µg/µl	TAGTTCTTTAGATCAAGTACTTTGCT		

<sup>1</sup> Se utilizó un solo *primer reverse* ya que este es complementario a una región consenso compartida por ambos virus. <sup>2</sup> Se utilizó un par de *primers* externos (B1 y B2A) para la 1° ronda de PCR y un segundo par de *primers* internos (B3 y B4A) para la *nested* PCR. pb: pares de bases. [con]: concentración de uso. (F): *primer forward*/sentido. (R): *primer reverse*/antisentido.

**Anexo 5. Reactivos y cantidad de producto de extracción (ARN) utilizados por reacción en las mezclas de transcripción reversa (RT) de BPIV-3, BVDV y BRSV.**

Reactivos	BPIV-3	BVDV	BRSV <sup>1</sup>
	μl		
M- MLV <i>buffer</i> 5X	5	2,5	5
Agua DEPC	7	6	10,25
<i>Primer</i> (F)	0,5	0,25	1 (1,5 pmol) B1
<i>Primer</i> (R)	0,5	0,25	1 (1,5 pmol) B2A
RNA <sub>sin</sub>	0,5	-	0,25
M-MLV RT	0,5	0,25	0,5
DNTPs	1	0,5	1
DTT	-	0,5	1
ARN	10	2,5	5
<b>Volumen final</b>	25	12,75	25

<sup>1</sup> Previo a la retrotranscripción, se mezclaron los *primers*, el agua DEPC y el ARN, se realizó desnaturalización del ARN a 65°C 5 min y posteriormente se colocaron en hielo 5 min.

**Anexo 6. Reactivos utilizados por reacción en las mezclas de PCR y cantidad de ADN o ADNc para detección de BoHV1 y 5, BPIV-3, BVDV y BRSV.**

Reactivos	BoHV1 y 5	BPIV-3	BVDV	BRSV	
				1° ronda	Nested
µl					
<b>Go Taq buffer 5X</b>	5	5	5	5	5
<b>Agua DEPC</b>	9,25	8,25	9,25	11,75	11,75
<b>Primer (F)</b>	1 de B1 y 1 de B5	0,5	1 (600 nM)	0,5 de B1 (1,5 pmol)	0,5 de B3 (15 pmol)
<b>Primer (R)</b>	1	0,5	1 (600 nM)	0,5 de B2A (1,5 pmol)	0,5 de B4A (15 pmol)
<b>MgCl2</b>	-	-	3	1,5	1,5
<b>GoTaq Polymerase</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>DNTPs</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>DMSO</b>	2	-	-	-	-
<b>ADN o ADNc</b>	5 de ADN	10 de ADNc	5 de ADNc	5 de ADNc	5 de 1° ronda <sup>1</sup>
<b>Volumen final</b>	25	25	25	25	25

<sup>1</sup> En los casos en que la primer ronda arrojó resultado positivo se adicionó solo 1 ul de producto de PCR de la 1° ronda en la *nested* PCR.

**Anexo 7. Programas de amplificación por PCR para BoHV1 y 5, BPIV-3, BVDV y BRSV.**

Pasos	BoHV1 y 5	BPIV-3	BVDV	BRSV <sup>1</sup>
				1° ronda y <i>nested</i>
<b>1- Desnaturalización inicial</b>	94 °C-3 min	94 °C-5 min	95 °C-10 min	94°C-5 min
<b>2- Ciclos de desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación</b>	40 ciclos: 94 °C-1 min 58 °C-1 min 72 °C-1 min	40 ciclos: 94 °C-30 s 50 °C-45 s 72 °C-1 min	35 ciclos: 94 °C-45 s 51 °C-30 s 72 °C-1 min	35 ciclos: 94 °C-45 s 50 °C-45 s 72 °C-1 min 30 s
<b>3- Elongación final</b>	72 °C-7 min	72 °C-7 min	72 °C-7 min	72 °C-7 min

<sup>1</sup> El perfil de ciclado para la 1° ronda de PCR así como para la *nested* PCR son iguales.



**Anexo 8. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.**

1- Desparafinado: 2 pasajes por xilol de 10 min cada uno. Escurrir bien.

2- Hidratación:

a. 1 pasaje por alcohol 100° 10 s

b. 1 pasaje por alcohol 96° 10 s

c. 1 pasaje por alcohol 70° 10 s

d. 1 pasaje por agua destilada.

3- Coloración con hematoxilina de Gill: 30 s a 3 min

4- Viraje en agua corriente: realizar 2 o 3 cambios de agua corriente

5- Enjuague en agua destilada

6- Coloración con eosina: 1 min

7- Deshidratación:

a. 2 pasajes por alcohol 96° 10 s

b. 2 pasajes por alcohol 100° 10 s

c. 2 pasajes por xilol 10 s

8- Montaje: con bálsamo de Canadá

**Anexo 9. Técnicas de inmunohistoquímica (BRSV, BVDV, BPIV-3 y BoHV1).**

- 1- Obtener cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor en portaobjetos positivados
  - 2- Desparafinado: 2 pasajes por xilol de 15 min cada uno. Escurrir bien
  - 3- Hidratación y bloqueo de peroxidasa endógena:
    - a. 2 pasajes por alcohol 100° de 10 min
    - b. 1 pasaje por solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 100 vol. al 3 % en metanol absoluto 30 minutos
    - c. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 min
    - d. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 min
    - e. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 min
  - 3- Lavado: 1 pasaje por PBS de 5 min
  - 4- Recuperación antigénica. Este paso se realizó para detección de BRSV, BVDV y BPIV-3, no para BoHV1. Ver métodos al final de este mismo anexo.
  - 5- Lavado: 3 pasajes por PBS de 5 min
  - 6- Bloqueo de uniones inespecíficas
- En los protocolos de BVDV, BPIV-3 y BoHV1 las muestras se incubaron con albúmina sérica bovina al 1 % en PBS 15 min a 4 °C en cámara húmeda.
- En el caso particular de BRSV el bloqueo de uniones inespecíficas incluyeron los siguientes pasos:
- a- Caseína al 5 % en PBS 15 min a 4 °C en cámara húmeda
  - b- Albúmina sérica bovina al 1 % en PBS 15 min a 4 °C en cámara húmeda

c- Suero normal equino (Ready to use 2,5 % normal horse blocking serum, Vector) 15 min a 4 °C en cámara húmeda

Nota: entre cada uno de los pasos se volcó el exceso de reactivo y se procedió con el paso siguiente.

7- Incubación con el anticuerpo primario. Incubar durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda

Los anticuerpos primarios y diluciones utilizadas fueron: BRSV (AB1128, Millipore, dilución 1:1000), BVDV (3.12F1, VMRD dilución 1:500), BPIV-3 (Mab 1B6, VMRD, dilución 1:500) y BoHV1 (F2, VMRD, dilución 1:3000). Para diluir los anticuerpos el diluyente comercial utilizado fue Da Vinci Green Diluent, Biocare Medical, USA.

8- Lavado: 3 pasajes por PBS de 5 min

9- Detección. Para BRSV se utilizó el kit de detección polímero ImmPRESS™ HRP Anti-Goat IgG (Vector). En el caso de BoHV1, BPIV-3 y BVDV el kit de detección LSAB2 ® System HRP (Dako).

#### BRSV:

a- Incubación con el polímero ImmPRESS™ HRP Anti-Goat IgG Peroxidase 30 min en cámara húmeda

#### BVDV, BPIV-3, BoHV1:

a- Incubar con el anticuerpo biotinilado kit LSAB2 ® System HRP 30 min en cámara húmeda

b- Lavado: 3 pasajes por PBS de 5 min

c- Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa kit de detección LSAB2 ® System HRP 30 min en cámara húmeda

10- Lavado: 3 pasajes por PBS de 5 min

11- Revelado. Incubar con solución de diaminobencidina (DAB) de 30 s a 3 min (kit de detección LSAB2 ® System HRP, Dako)

12- Lavado: 1 pasaje por con agua corriente 5 min

13- Lavado: 1 pasaje por con agua destilada 5 min

14- Coloración de contraste con hematoxilina de Gill 30 s a 3 min

15- Viraje en agua corriente: realizar 2 o 3 cambios de agua corriente 10 min

16- Enjuague en agua destilada 5 min

17- Deshidratación:

a. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 min

b. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 min

c. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 min

d. 2 pasajes por alcohol 100° de 5 min

e. 2 pasajes por xilol de 5 min

18- Montaje con bálsamo de Canadá

Métodos de recuperación antigénica utilizados en cada caso

BRSV- método enzimático (tripsina):

a- Precalentar la cámara húmeda en estufa a 37 °C durante 10 minutos.

b- Cubrir los cortes con la solución de tripsina 0,1 % (1 mg/ ml) en PBS.

c- Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda 10 min en estufa a 37 °C.

BVDV- método enzimático (proteasa XIV):

a- Precalear la cámara húmeda en estufa a 37 °C durante 10 minutos.

b- Cubrir los cortes con la solución de proteasa XIV 0,1 % (1 mg/ ml) en PBS.

c- Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda 8 min en estufa a 37 °C.

BPIV-3 - calor húmedo a alta presión (“olla a presión”):

a- Precalear el *buffer* citrato en la olla a presión hasta ebullición.

b- Colocar los portaobjetos en el buffer y tapar la olla. Esperar hasta ser alcanzada la presión máxima y, a partir de ese momento mantener por 2 min.

c- Dejar enfriar 20 min en el *buffer* citrato.

Nota: Los pasos en los que no se especificó la temperatura se realizaron a temperatura ambiente.

Preparación de soluciones necesarias para realizar las técnicas de IHQ

PBS Stock - *buffer* de fosfato 0,1 M (PB) PH 7,4:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sodio dibásico anhidro)----- 11,4 g

o

- NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (fosfato de sodio monobásico anhidro)----- 2,54 g

-Agua destilada----- 1000 ml

Buffer salino fosfato (PBS) pH 7,4:

- ClNa----- 8,5 g
- PBS Stock----- 100 ml
- Agua destilada----- 900 ml

Buffer citrato pH 6:

- Ac. cítrico anhidro ( $H_3C_6H_5O_7$ ) PM= 192,43----- 1,92 g
- o
- Ac. cítrico monoanhidrato ( $H_3C_6H_5O_7H_2O$ ) PM= 210,43----- 2,1 g
- Agua destilada----- 1000 ml

Nota: una vez preparada la solución ajustar pH con hidróxido de sodio 2 N.

**Anexo 10. Lesiones pulmonares macroscópicas, microscópicas y diagnóstico final en 44 bovinos de EC con lesiones de ERB.**

ID	LESIÓN MACRO	CONS PULMÓN	LESIÓN MICRO	LESIÓN BRONQ	CURSO	DIAG FINAL
B936	NI	NA	NI	OLB	A	ERB
A848*	BN	55	BFS	NB	C	ERB
B773	BN	64	BFS	NB	A	ERB
A436	BN	43	BFS	NB+BO	C	ERB
1287	NI	NA	NBI	NB	A	PEM
A858	BN	24	BFS	NB	A	SPD
B910	BN	85	BFS	NB+BO	C	ERB
C354	BN	73	BFS	NB+BO	C	ERB
D573	NI	NA	NI	OLB	A	PEM
A071	BN	61	BFS	NB	SA	ERB
B666	NI	NA	NI	OLB	A	SPD
C280	BN	39	BFS	BO	A	ERB
A292	NI	NA	NI	SLB	A	endocarditis
A688**	BN	6	BFS	NB	A	urolitiasis
A724	BN	23	BFS	NB	C	pericarditis
A100	BN	16	BFS	NB	C	SNADAP
A784	BN	40	BFS	NB	A	ERB
E114	BN	17	BFS	NB	A	GEV
A775	NI	NA	NI	OLB	A	acidosis
C889	NI	NA	NI	OLB	A	acidosis
A139	BN	11	BFS	NB	SA	timpanismo
E760	BN	49	BFS	NB+BO	C	ERB
A131	BN	61	BFS	NB	A	ERB
A649	BN	44	BFS	NB	SA	ERB
A430	NI	NA	NI	OLB	A	ERB
A431	Br	NA	BB	BO	C	salmonelosis
A645	BN	41	BCN	NB+BO	C	ERB
6039	BN	46	BFS	NB	SA	ERB
10	BN	9	BFS	NB+BO	SA	acidosis
B106	NI	NA	NI	SLB	A	SPD
C536	BN	19	BFS	NB	SA	MET
A331	BN	6	BFS	NB+BO	SA	coccidiosis
A086	BN	17	BFS	BO	C	SPD
1	BN	3	BFS	NB	A	SPD
2	BN	8	BFS	NB	A	SPD

<b>4</b>	BN	8	BFS	NB	A	SPD
<b>11</b>	BN	43	BFS	NB	A	ERB
<b>12</b>	BN	40	BFS	NB	A	ERB
<b>13</b>	BN	4	BFS	NB+BO	A	SPD
<b>14</b>	BN	2	BFS	NB	A	SPD
<b>15</b>	BN	36	BFS	NB	A	ERB
<b>A-1</b>	BN	16	BFS	NB	C	ERB
<b>A-7</b>	BN	20	BFS	NB	C	ERB
<b>A9040</b>	BN	36	BFS	NB+BO	C	ERB

\* escasos sincitios alveolares. \*\* escasos sincitios bronquiolares. ID: caravana de identificación del animal. LESIÓN MACRO: patrón de lesión pulmonar macroscópica. CONS PULMONAR: porcentaje de consolidación pulmonar total en casos de bronconeumonía. LESIÓN MICRO: patrón de lesión pulmonar microscópica. LESIÓN BRONQ: lesión bronquiolar. CURSO: curso de lesión pulmonar. DIAG FINAL: diagnóstico definitivo o causa de muerte sobre la base de los antecedentes clínicos, hallazgos de necropsia, lesiones histológicas y estudios complementarios. BN: consolidación pulmonar craneoventral compatibles con bronconeumonía, NI: pulmones con lesiones compatibles con neumonía intersticial o broncointersticial, Br: pulmones con bronquitis y/o patrón lobulillar de atelectasia. NA: no aplica. BFS: bronconeumonía fibrinosupurativa, BCN: bronconeumonía caseonecrotica, NI: neumonía intersticial, BB: bronquitis y/o bronquiolitis, NBI: neumonía broncointersticial. NB: necrosis bronquiolar, BO: bronquiolitis obliterante, NB+BO: necrosis bronquiolar con bronquiolitis obliterante, OLB: otra lesión bronquiolar, SLB: sin lesión bronquiolar. A: agudo, SA: subagudo, C: crónico. ERB: enfermedad respiratoria bovina, PEM: polioencefalomalacia, SPD: sin posibilidad diagnóstica, SNADAP: síndrome de no adaptación, GEV: gastroenteritis verminosa, MET: meningoencefalitis trombótica.



**Anexo 11. Días en el engorde a corral al momento de la necropsia y agentes etiológicos (virales y bacterianos) detectados en 44 bovinos de EC con lesiones de ERB.**

ID	DÍAS	VIRUS DETECTADOS								BACTERIAS AISLADAS
		BRSV		BVDV		BPIV-3		BoHV1		
		IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	
<b>B936</b>	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A848</b>	15	-	POS	-	-	-	-	POS	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>B773</b>	14	-	POS	-	-	POS	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>A436</b>	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1287</b>	60	-	-	-	-	-	-	-	POS	-
<b>A858</b>	14	-	-	-	-	POS	-	-	-	<i>M. haemolytica</i> + <i>Pasteurella multocida</i>
<b>B910</b>	80	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pasteurella multocida</i>
<b>C354</b>	60	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>D573</b>	34	-	POS	-	POS	-	-	-	-	-
<b>A071</b>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B666</b>	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C280</b>	137	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A292</b>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A688</b>	7	POS	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>A724</b>	10	-	-	-	POS	-	-	-	-	-
<b>A100</b>	15	-	POS	-	-	POS	-	-	-	<i>Trueperella pyogenes</i>
<b>A784</b>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>E114</b>	25	-	-	-	-	POS	-	-	-	-
<b>A775</b>	40	-	POS	-	-	-	-	-	-	<i>Trueperella pyogenes</i>

<b>C889</b>	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A139</b>	30	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i> + <i>Trueperella pyogenes</i>
<b>E760</b>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H. somni</i>
<b>A131</b>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>A649</b>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A430</b>	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Trueperella pyogenes</i>
<b>A431</b>	15	-	-	POS	-	-	-	-	-	-	-
<b>A645</b>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H. somni</i>
<b>6039</b>	10	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	<i>H. somni</i>
<b>10</b>	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B106</b>	12	-	-	-	POS	-	-	-	-	-	-
<b>C536</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pasteurella multocida</i>
<b>A331</b>	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A086</b>	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pasteurella multocida</i>
<b>1</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>2</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>4</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>11</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>12</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>13</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>14</b>	15	-	-	POS	POS	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>15</b>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>M. haemolytica</i>
<b>A-1*</b>	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A-7*</b>	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A9040</b>	26	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	<i>H. somni</i>

\* Animales positivos para BoHV1 a partir de muestras de tráquea. IHQ: inmunohistoquímica. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. BACTERIOLOGÍA: cultivo y aislamiento bacteriológico. ID: caravana de identificación del animal. BRSV: virus respiratorio sincicial bovino, BVDV: virus de la diarrea viral bovina, BPIV-3: virus parainfluenza 3 bovino, BoHV1: alfa herpesvirus bovino 1. *H. somni*: *Histophilus somni*, *M. haemolytica*: *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida*: *Pasteurella multocida*, *T. pyogenes*: *Trueperella pyogenes*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*. - : agente viral o bacteriano no identificado. POS: detección del agente viral analizado. DÍAS: días en el engorde a corral al momento de la necropsia.