

Seroconversión al VDVB en vacas coinfectadas con VLBE y HVB-1: fundamento de la calostrogénesis y efecto de la infección persistente causada por el VDVB¹

Derling Pichardo-Matamoros² ✉  *Jorge Alberto Elizondo-Salazar³ ✉  Carlos Jiménez-Sánchez⁴ ✉ 

Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Seroconversion to BVDV in cows coinfecting with BLV and BHV-1: basis of colostrum generation and effect of persistent infection caused by BVDV

Abstract. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine leukaemia virus (BLV), and bovine herpesvirus-1 (BHV-1) are very important pathogens in specialized dairies due to the negative impact they cause. Vaccination with BVDV is elementary to reduce its incidence and increase the concentration of antibodies in colostrum during colostrum generation. This study evaluated whether the change in the vaccination program using live attenuated virus at one or two doses modified the serological status against BVDV in cows co-infected with VLBE and HVB-1. A vaccination trial against BVDV using the EXPRESS® FP 10-HS vaccine was conducted from November 8 to December 20, 2018. The study included 20 Holstein cows, of which 17 were seronegative for BVDV at baseline values of the study (0 days) and coinfecting with VLBE and HVB-1. Changing the health status of BVDV seronegative to seropositive cows by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indicated seroconversion. The seroconversion monitoring of each cow was established at 21 and 42 days post-vaccination by ELISA. The seroconversion obtained was 93.75% (15/16), therefore, the vaccination program against BVDV was very efficient to achieve seroconversion independently of the dose, except in one animal with persistent infection for BVDV. Also, the presence of VLBE and HVB-1 did not inhibit antibody production. The information obtained suggests that mobilization of antibodies against BVDV into colostrum would occur without difficulty in co-infected animals that do not experience persistent infection with BVDV.

Key words: bovine, immunity, vaccination, immunosuppression, colostrum.

Resumen. Los virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus de la leucosis bovina enzoótica (VLBE) y herpesvirus bovino 1 (HVB-1) son patógenos muy importantes en lecherías especializadas debido al impacto negativo que ocasionan. La vacunación con el VDVB es elemental para reducir su incidencia e incrementar la concentración de anticuerpos en el calostro durante la calostrogénesis. Este estudio evaluó si el cambio en el programa de vacunación empleando virus vivo atenuado a una o dos dosis modificaba el estatus serológico contra el VDVB en vacas coinfectadas con VLBE y HVB-1. Se realizó un ensayo de vacunación contra el VDVB empleando la vacuna EXPRESS® FP 10-HS desde el 8 de noviembre al 20 de diciembre del 2018. El estudio incluyó 20 vacas de raza Holstein, de las cuales 17 fueron seronegativas para el VDVB al inicio del estudio (0 días) y coinfectadas con VLBE y HVB-1. El cambio del estatus sanitario de las vacas seronegativas al VDVB a seropositivas mediante la prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) indicó seroconversión. El seguimiento de la seroconversión de cada vaca fue establecido a los 21 y 42 días post-vacunación mediante ELISA. La seroconversión obtenida fue de 93.75 % (15/16), por lo que, el programa de vacunación contra VDVB fue muy eficiente para lograr seroconversión de forma independiente de la dosis, excepto en un animal con infección persistente para el VDVB. Asimismo, la presencia del

Recibido: 2020-07-05. Aceptado: 2020-09-30.

¹Este trabajo formó parte del proyecto de investigación inscrito en la Vicerrectoría de Investigación, No. 737-B4-222. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

²Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agroalimentarias (FCA), Universidad de Costa Rica.

³*Autor para la correspondencia: e-mail: jorge.elizondosalazar@ucr.ac.cr. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Estación Experimental Alfredo Volio Mata.

⁴Universidad Nacional de Costa Rica. Escuela de Medicina Veterinaria. Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales y Unidad de Diagnóstico e Investigación en Virología Veterinaria.

VLBE y HVB-1 no inhibió la producción de anticuerpos. La información obtenida sugiere que la movilización de anticuerpos contra el VDVB hacia el calostro ocurriría sin dificultad en animales coinfectados que no experimentan infección persistente con el VDVB.

Palabras Claves: bovinos, inmunidad, vacunación, inmunosupresión, calostro.

Introducción

Los problemas de salud en el hato impactan de forma negativa la eficiencia productiva y reproductiva del rebaño, en especial, los ocasionados por enfermedades infecciosas, las cuales limitan significativamente la sostenibilidad de las fincas (Glass *et al.*, 2012, Gutiérrez *et al.*, 2017, Barrett *et al.*, 2018). En tal sentido, las infecciones ocasionadas por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (Reichel *et al.*, 2018, Wathes *et al.*, 2019), virus de la leucosis bovina enzoótica (VLBE) (Juliarena *et al.*, 2017) y herpesvirus bovino 1 (HVB-1) (Dunn *et al.*, 2018, Wathes *et al.*, 2019) son de gran relevancia en ganado lechero.

La infección con el VDVB, un *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*, ocasiona pérdidas a nivel mundial que varían de 33 a 687 dólares por animal infectado debido a problemas productivos y reproductivos (Richter *et al.*, 2017, Reichel *et al.*, 2018). Por lo general, la infección se presenta de modo inaparente o cursa con fiebre, inmunosupresión, diarrea o alteraciones respiratorias (Cho y Yoon 2014, Givens y Newcomer 2017, Wathes *et al.*, 2019).

El VLBE, un *Deltaretrovirus* dentro de la familia *Retroviridae*, causa una enfermedad llamada leucosis bovina enzoótica que cursa de forma crónica con disfunción del sistema inmune y consecuente deterioro de la calidad del calostro (Frie y Coussens 2015, Suzuki *et al.*, 2015, Blagitz *et al.*, 2017, Iwan *et al.*, 2017). Así mismo, se ha sugerido que una alta prevalencia del VLBE favorece la incidencia de HVB-1 y del VDVB (Bilge-Dagalp *et al.*, 2008, Nikbakht *et al.*, 2015).

Por su parte, HVB-1 es un *Varicellovirus* dentro de la familia *Herpesviridae*, causa comúnmente una enfermedad contagiosa llamada rinotraqueitis infecciosa bovina que también provoca inmunosupresión, alteraciones respiratorias y reproductivas (Dunn *et al.*, 2018, Jones 2019). En consecuencia, la asociación de HVB-1 con el VLBE podría aumentar el impacto negativo sobre el sistema inmune.

En Costa Rica, se confirmó la presencia del VLBE en 1995 (Jiménez *et al.*, 1995), está presente en el 97.4 % de los hatos de ganado lechero especializado con incidencias por finca mayores al 40 % y causa grandes

pérdidas productivas (Romero *et al.*, 2012, 2015). Por su parte, las enfermedades generadas por HVB-1 y VDVB son endémicas (Raizman *et al.*, 2011).

En regiones endémicas al VDVB, el suministro de calostro con anticuerpos específicos en terneros es esencial para reducir la incidencia de diarrea neonatal y neumonía enzoótica en los primeros tres meses de vida. Normalmente, el consumo de calostro con anticuerpos contra el VDVB favorece la supervivencia de los terneros debido a la neutralización del virus por los anticuerpos transferidos de forma pasiva mientras su sistema inmune madura (Chase *et al.*, 2008, Pardon *et al.*, 2012, Chamorro *et al.*, 2014, Cho y Yoon 2014).

El calostro bovino es una mezcla de secreción láctea y componentes del suero sanguíneo, rico en anticuerpos y proteínas séricas, las cuales se depositan en la glándula mamaria comúnmente 21 días antes del parto (Castro *et al.*, 2011, Woolums 2014, De Paula *et al.*, 2019). Por tanto, la vacunación de las madres contra el VDVB ayuda a disminuir la ocurrencia de nuevas infecciones (Givens y Newcomer 2017, Reichel *et al.*, 2018). La nutrición también influye de forma significativa sobre el desarrollo de la respuesta inmune a la vacunación y calidad del calostro materno, por lo que, durante la síntesis del calostro el sistema inmune debe estar saludable para promover el éxito de la transferencia pasiva de inmunidad específica de tipo humoral contra los virus (Castro *et al.*, 2011, Morrill 2011, Maunsell 2014, Woolums 2014).

No obstante, la obtención de calostro con anticuerpos específicos contra el VDVB a partir de vacas con leucosis bovina enzoótica y coinfectadas con HVB-1 no está completamente dilucidado (Farias *et al.*, 2016, Frie *et al.*, 2016, 2017; Jaworski *et al.*, 2018). Además, los programas de vacunación muchas veces no son muy eficientes debido al uso de vacunas inactivadas con bajo potencial antigénico o empleo de vacunas atenuadas con alto riesgo para provocar abortos o nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI) (Givens y Newcomer 2017, Kato *et al.*, 2015, Walz *et al.*, 2017). A la fecha, no hay información sobre el efecto inmunosupresor causado por el VLBE y HVB-1 en conjunto sobre el desarrollo natural de la respuesta inmune humoral específica contra el VDVB,

seroconvirtan contra el VDVB cuando son vacunados. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar en vacas coinfectadas con VLBE y HVB-1 si el programa

de vacunación contra el VDVB basado en una o dos dosis de virus vivo modificado estimulaba la seroconversión.

Materiales y Métodos

Finca y animales

Se seleccionó una finca seropositiva para la presencia del VLBE y sin antecedentes de vacunación contra el VDVB en los últimos tres años, localizada en San Carlos, Alajuela. Se obtuvo el consentimiento firmado del propietario antes de muestrear y vacunar a las vacas. Se eligieron 82 vacas en producción (57 Holstein y 25 Jersey), multíparas (2 a 8 lactancias) y desde 67 a 270 días de lactación para determinar la presencia del VLBE, VDVB y HVB-1 mediante pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). Finalmente, se escogieron 20 vacas de raza Holstein coinfectadas con VLBE y HVB-1 para diseñar el experimento.

Toma y procesamiento de las muestras de sangre

Muestras de sangre fueron extraídas al inicio del estudio, antes y después del programa de vacunación durante el estudio experimental. Se recolectaron siete mL de sangre usando tubos de ensayo sin anticoagulante por punción de la vena coccígea empleando el sistema vacutainer®. El suero fue separado de la sangre a 4500 r.p.m. x 5 min y mantenido a 4 °C o -20 °C hasta su utilización en el ELISA. Las muestras de suero fueron conservadas a -75 °C.

Diseño experimental

Cuadro 1. Características de las unidades experimentales.

UE	Edad o días (Años/Lactancia)	Estatus serológico 0 días		Preñez 0 días (Días)	Estatus serológico para VDVB		
		VLBE	HVB-1		Estatus (0 días)	Vacunación (Dosis)	Seroconversión (42 días)
1	4/2	+	+	161	-	0	-
2	7/5	+	+	0	+	0	+
3	7/5	+	+	0	+	0	+
4	11/8	+	+	100	+	0	+
5	5/3	+	+	0	-	1	+
6	8/5	+	+	173	-	1	+
7	7/4	+	+	0	-	1	-
8	7/6	+	+	0	-	1	+
9	8/5	+	+	0	-	1	+
10	8/6	+	+	0	-	2	+
11	5/3	+	+	0	-	2	+
12	5/3	+	+	0	-	2	+
13	6/4	+	+	0	-	2	+
14	6/4	+	+	0	-	2	+
15	7/5	+	+	0	-	2	+
16	7/6	+	+	0	-	2	+
17	7/6	+	+	0	-	2	+
18	7/6	+	+	0	-	2	+
19	7/6	+	+	0	-	2	+
20	4/2	+	+	203	-	2	+

(UE) = Unidad Experimental, (+) = Positivo, (-) = Negativo.



Valoración de la seroconversión al VDVB

El cambio del estatus sanitario de las vacas seronegativas para el VDVB y vacunadas contra el VDVB a seropositivas fue determinado mediante la prueba ELISA (ID Screen® BVD p80 Antibody Competition), lo que indicó seroconversión. La prueba ID Screen® BVD p80 Antibody Competition fue válida si la media de la densidad óptica (DO) del control negativo fue superior a 0.7 ($DO_{CN} > 0.7$) y si la media de la DO del control positivo fue inferior al 30 % de la DO del control negativo ($DO_{CP}/DO_{CN} < 0.30$). Además, una muestra se consideró positiva si el porcentaje de competencia (S/N %) fue inferior o igual al 40 % ($S/N \% \leq 40 \%$), dudoso si el $40 \% < S/N \% \leq 50 \%$ y negativo si el $S/N \% > 50 \%$. Como resultado, el punto de corte fue S/N % :40-50. La lectura de la placa de ELISA se realizó a 450 nm empleando un espectrofotómetro especializado (MULTISKAN ASCENT, Thermo, USA) mediante el programa IDSoft v3.10 (ID.vet, Grabels, France). El incremento en la concentración de anticuerpos anti-p80 fue determinado mediante el porcentaje de inhibición, que es la medición inversa al porcentaje de competencia y fue estimado por medio de la fórmula propuesta por Machado *et al.* (2015). En consecuencia, los animales que incrementaron los niveles de anticuerpos, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 50 %.

$$PI (\%) = [(DO_{CN} - DO_{Muestra \ O \ CP}) / DO_{CN}] \times 100$$

Se realizaron tres intervenciones. La primera fue la evaluación base (E0), que permitió constatar el estatus asociado con la presencia del VLBE, HVB-1 y del estatus serológico relacionado con el VDVB de cada vaca a los cero días de iniciado el ensayo, así como, aplicar la primera dosis de vacuna; la segunda evaluación (E1) fue realizada a los 21 días post-vacunación para valorar la seroconversión, el estado nutricional del hato y aplicar la segunda dosis de la vacuna en las vacas asignadas al programa de vacunación con dos dosis. Finalmente, se efectuó la tercera evaluación (E2) a los 42 días post-vacunación para determinar la seroconversión contra el VDVB y estado general de la nutrición en el hato al final del ensayo.

Detección del VLBE y HVB-1 por serología

La seroprevalencia del VLBE y HVB-1 fueron valoradas utilizando ID Screen® BLV Competition (ID.vet, Grabels, France) y ID Screen® IBR gB Competition (ID.vet, Grabels, France), respectivamente. El procedimiento de cada ELISA fue efectuado con base en las instrucciones del fabricante.

Caracterización molecular de la infección persistente causada por el VDVB

Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción: la extracción de ARN viral se realizó a partir de 250 µL de suero sin anticoagulante empleando Trizol (Ambion, USA) con base en las instrucciones del fabricante. El ARN extraído fue utilizado de forma inmediata para sintetizar ADN complementario empleando RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lituania) según instrucciones del fabricante. El ARN y el ADN complementario obtenidos fueron conservados a -75 °C hasta su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador 2 720 (Applied Biosystems, USA).

PCR para detectar el VDVB: la caracterización molecular del VDVB se realizó empleando el dos pares de cebadores, 324(+)/326(-) y BP189-389(+)/DVB(-), dirigidos a la región 5'-UTR y 5'-UTR-Erns, respectivamente. El cebador 324 corresponde a los nucleótidos 108-128 del VDVB y tiene la secuencia 5'-ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA-3', mientras, el cebador 326 corresponde a los nucleótidos 395-375 del VDVB y tiene la secuencia 5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3' (Monteiro *et al.*, 2019). Por su parte, el cebador BP189-389 corresponde a los nucleótidos 190-207 del VDVB y tiene la secuencia 5'-AGTCGTCARTGGTTCGAC-3' (Monteiro *et al.*, 2019), mientras, el cebador DVB-R corresponde a los nucleótidos 1367-1348 del VDVB y tiene la secuencia 5'-TTYTCRCTNGCRTCCATCAT-3' (UNDIVE 2020). El volumen final de cada reacción de PCR empleando los cebadores 324(+)/326(-) fue de 20 µL y consistió en 10 µL de Phusion U Multiplex PCR Master Mix #F-562S (Invitrogen, USA); 1.2 µL (0.3 µ M/µL) de cada uno de los cebadores, 5.6 µL de H₂O libre de ARNasas (Invitrogen, USA) y 2 µL de ADN complementario. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C x 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C x 20 s, anillamiento a 58 °C x 30 s y extensión a 72 °C x 15 s, seguido de una extensión final a 72 °C x 5 min (UNDIVE 2020). El producto esperado fue de 288 pb.

Posteriormente, se realizó el PCR para amplificar la región parcial de la poliproteína del VDVB desde 5'-UTR a la región Erns usando los cebadores BP189-389(+)/DVB(-). El volumen final de cada reacción de PCR fue de 20 µL y consistió en 10 µL de Phusion U Multiplex PCR Master Mix #F-562S (Invitrogen, USA); 2 µL (0.5 µ M/µL) de cada uno de los cebadores, 4 µL de H₂O libre de ARNasas (Invitrogen, USA) y 2 µL de ADN complementario. Las condiciones de la reacción

fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C x 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C x 20 s, anillamiento a 60 °C x 30 s y extensión a 72 °C x 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C x 10 min (UNDIVE 2020). El producto esperado fue de 1178 pb.

Electroforesis: los productos amplificados por PCR fueron separados en gel de agarosa al 2 % y teñidos con GelRed Nucleic Acid Stain 10000X in Water (Biotium, USA). Se emplearon 2 µL de buffer de muestra 6X DNA Loading Dye #RO611 (Fermentas, Lituania) y 1 µL (0.5 µg / gL) de GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus #SM0321 (Fermentas, Lituania). La separación de los amplicones se realizó empleando el equipo de electroforesis Fotodyne Model N°1-1430 a 80 v x 40 min, una vez separados se visualizaron en el captador de imágenes e iluminador ultravioleta (UVP BioDoc-1t™ Imaging System/FirstLight UV illuminator, USA).

Secuenciación y análisis de secuencias: el amplicón de ADN de cada PCR positiva fue purificado con ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, USA) según instrucciones del fabricante y luego fue almacenado a -75 °C hasta su envío a Macrogen (Macrogen Co., Ltd., Corea del Sur) para ser secuenciado según el método de Sanger. Posteriormente, las secuencias de referencia [cepas NADL (número de acceso al GenBank: AJ133739) y Singer (número de acceso al GenBank: MH133206)] dentro del genotipo VDVB-1a fueron encontradas mediante la herramienta de búsqueda para la alineación básica local de nucleótidos (BLASTn) (NCBI 2019). Luego, las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v6) y se alinearon usando ClustalW 1.6 (Tamura *et al.*, 2013). Las

secuencias correspondientes a la muestra de ADN positiva en ambas PCR fueron concatenadas y se cargó al GenBank una secuencia única de 1194 nucleótidos (cepa ABART-2 asignada dentro del genotipo del VDVB-1a, número de acceso: MTO24564).

Calidad nutricional

En un subgrupo de vacas, tomadas al azar, se evaluó de manera general la eficiencia del plan nutricional cuantificando beta-hidroxibutirato (BHBA) y glucosa en sangre mediante FreeStyle Optium Neo Strip β-ketone and Glucose Monitoring System (Abbott Diabetes Care Ltd., UK) con base en lo planteado en la literatura para la valoración a nivel de hato (Oetzel 2015). Se consideró un caso de cetosis subclínica cuando se determinó un nivel de 1.2 mmol/L a 3.0 mmol/L de BHBA según Iwersen *et al.*, (2013), Oetzel (2015) y Brunner *et al.*, (2019), así como, un desequilibrio en el metabolismo de la glucosa cuando sus valores en sangre no fueron normales (40 mg/dL de glucosa ≤ normoglicemia ≤ 60 mg/dL de glucosa) conforme lo descrito por Mair *et al.*, (2016).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa InfoStat v2018I (Di Rienzo *et al.*, 2011) y la significancia del análisis fue establecida con un valor de $p \leq 0.05$. La asociación entre el programa de vacunación estándar y de una dosis sobre la seroconversión contra el VDVB fue evaluada en los grupos usando la prueba exacta de Fisher bidireccional. También, se generaron gráficos de densidad de puntos para las concentraciones de cada variable cuantitativa.

Resultados

Presencia del virus de la leucosis bovina enzoótica (VLBE), virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y herpesvirus bovino 1 (HVB-1)

De un total de 82 sueros evaluados mediante pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas, se determinó la presencia del VLBE en 95.1 % (78/82) de las muestras. Luego, se estimó en un subgrupo de muestras un 29.3 % (17/58) seropositivas para el VDVB y un 95.7 % (45/47) seropositivas para HVB-1.

Seroconversión contra el VDVB y calostrogénesis

La evaluación de una vaca no vacunada-seronegativa al VDVB, desde el inicio hasta el final del ensayo, sugiere que durante el estudio no hubo infección activa en el hato; asimismo, tres vacas no vacunadas-seropositivas desde el inicio del experimento mantuvieron su estatus a los 42 días sin mostrar incremento significativo en el porcentaje de inhibición, lo que refuerza la noción de la ausencia de infección causada por el VDVB durante la investigación. Además, las vacas vacunadas mostraron un porcentaje de inhibición que osciló entre 83 y 93 %, lo que indicó que el 93.75 % (15/16) de las vacas vacunadas-seronegativas seroconvirtieron contra el VDVB (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Seroconversión en animales vacunados contra el VDVB.

UE	PV	Porcentaje de inhibición (%)			UE	PV	Porcentaje de inhibición (%)		
		0 días	21 días	42 días			0 días	21 días	42 días
1	0	11	10	11	11	2	5	71	81
2	0	95	93	94	12	2	27	72	92
3	0	90	90	91	13	2	8	79	90
4	0	87	91	89	14	2	13	78	91
5	1	13	NA	87	15	2	24	69	83
6	1	16	NA	84	16	2	12	72	91
7	1	20	NA	11	17	2	6	70	88
8	1	12	NA	88	18	2	4	63	80
9	1	7	NA	85	19	2	16	75	87
10	2	5	49	87	20	2	4	68	88

(UE) = Unidad Experimental, (PV) = Programa de vacunación, (NA) = No analizado.

Cuadro 3. Contingencia para estudiar la independencia entre el programa de vacunación y la seroconversión contra VDVB.

Programa de vacunación	Seroconversión		Total
	Sí	No	
1	4	1	5
2	11	0	11
Total	15	1	16

Para un valor del estadístico Irwin-Fisher bilateral de 0,20 se genera un valor de $p = 0.3125$, lo que indica que las variables son independientes. Para una significancia estadística de $\alpha \leq 0.05$, se concluye que la diferencia observada no refleja una verdadera diferencia entre los grupos. 1, Aplicación de una dosis de vacuna contra VDVB; 2, Aplicación de dos dosis de vacuna contra VDVB.

Enfermedades metabólicas

La nutrición y los problemas metabólicos afectan la respuesta inmune. El análisis individual de los casos permitió identificar cuatro vacas con cetosis subclínica y una con hipoglucemia en la evaluación base (0 días) y otra vaca con hipoglucemia al final del ensayo (42 días). La valoración a nivel de hato indicó que al inicio del estudio el 40 % (4/10) de las vacas experimentaban cetosis subclínica, lo que superó el 10 % de los casos como valor umbral para intervenir el plan nutricional. Sin embargo, las valoraciones siguientes (a los 21 y 42 días) no superaron el umbral y los casos de cetosis subclínica e hipoglucemia fueron estados transitorios y en animales diferentes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de beta-hidroxibutirato (BHBA) y glucosa en sangre.

Caso	Evaluaciones de BHBA (mmol/L)			Evaluaciones de glucosa (mg/dL)		
	0 días	21 días	42 días	0 días	21 días	42 días
1	1.7	0.7	0.4	45	56	45
2	0.9	0.9	0.6	52	44	40
3	1.2	0.6	0.8	52	46	43
4	1.2	0.7	0.5	43	49	42
5	0.8	0.9	0.6	48	48	44
6	0.6	0.6	0.9	38	45	48
7	0.6	0.8	0.5	47	49	42
8	1,3	0.3	0.9	50	49	49
9	0.7	NA	0.8	43	NA	48
10	0.6	NA	0.4	48	NA	37
11	NA	NA	NA	NA	NA	47

(NA)= No analizado.

En general, las concentraciones de beta-hidroxibutirato sanguíneo (BHBA) y glucosa se

ubicaron dentro del rango normal para la especie (Figura 1).

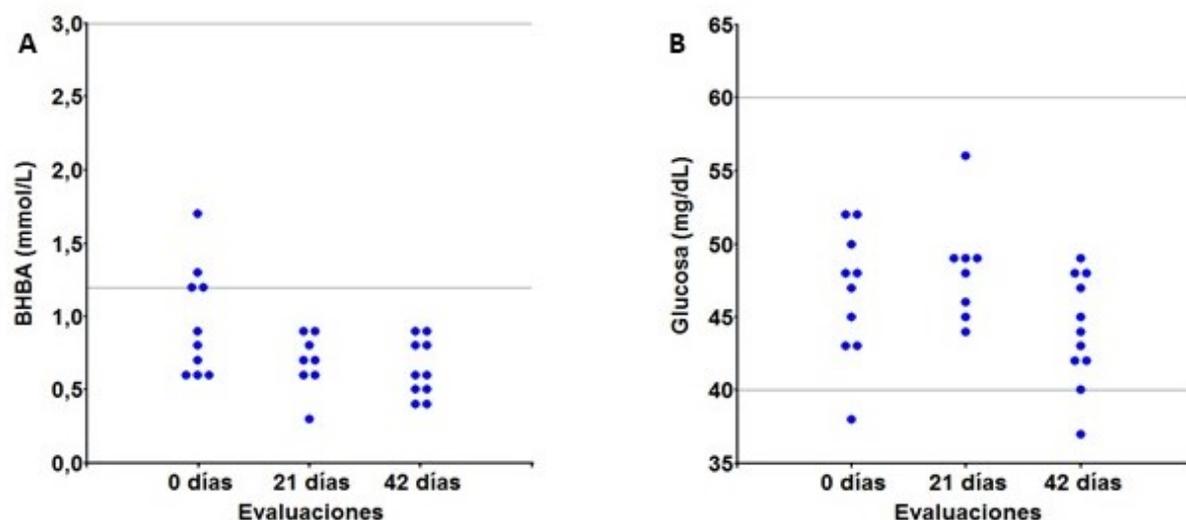


Figura 1. Evaluación del estado nutricional de las vacas a nivel de hato durante la vacunación contra VDV. (A) Concentración de beta-hidroxiacetato en sangre, las líneas horizontales representan el rango en el cual se presentó cetosis subclínica (1.2 mmol/L de BHBA \leq cetosis subclínica \leq 3.0 mmol/L de BHBA). (B) concentración de glucosa en sangre, las líneas horizontales indican un estatus normoglucémico (40 mg/dL de glucosa \leq normoglucemia \leq 60 mg/dL de glucosa). Los niveles de BHBA y glucosa fueron determinados antes de la vacunación (evaluación base a los 0 días), a los 21 días después de haber aplicado la primera dosis de vacuna o durante la revacunación y a los 42 días después de haber iniciado el programa de vacunación.

Discusión

Seroconversión contra el VDV en animales vacunados y naturalmente coinfectados con VLBE y HVB-1

Las vacas coinfectadas respondieron de forma excelente a la inmunización contra el VDV, independientemente si se empleó un programa de vacunación de una o dos dosis, lo cual indica que el efecto de la coinfección con VLBE y HVB-1 no impide la seroconversión y permite inferir que el efecto inmunosupresor de estos virus es parcial e independiente. Además, no hubo aborto en vacas preñadas vacunadas-seronegativas incluidas en el estudio.

Dado que, se ha informado que en animales seropositivos al VLBE la evolución de la respuesta inmune es anormal debido a alteraciones en la producción y actividad de elementos humorales importantes para desarrollar una respuesta inmune humoral eficiente (Frie y Coussens 2015, Farias *et al.*, 2016, Frie *et al.*, 2017), el efecto sobre el sistema inmune podría incrementarse por el sinergismo con HVB-1 (Bilge-Dagalp *et al.*, 2008, Jones 2019). No obstante, el resultado obtenido en este estudio sugiere que el efecto de la coinfección con estos virus, en caso de existir sinergismo, no es tan fuerte como para inhibir la seroconversión contra el VDV en los animales vacunados con virus vivo atenuado. De forma

similar, Jaworski *et al.*, (2018) reportaron que el VLBE no afecta los niveles de anticuerpos obtenidos cuando se vacuna contra el virus de la fiebre aftosa y Frie *et al.*, (2016) describieron que las vacas infectadas con VLBE generan anticuerpos contra el VDV de forma semejante a las vacas seronegativas vacunadas con virus vivo modificado.

En ese mismo sentido, si el efecto inmunosupresor del VLBE y HVB-1 no es suficiente para impedir el desarrollo de una respuesta inmune eficaz contra el VDV, las diferencias encontradas en distintas investigaciones sobre el efecto inmunosupresor del VLBE (Farias *et al.*, 2016; Frie *et al.*, 2016, 2017, 2018; Jaworski *et al.*, 2018) podrían explicarse por el sinergismo con otros factores aún no conocidos o parcialmente descritos que pueden aumentar el efecto inmunosupresor. Por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia bovina, un *Lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae* también causa infección persistente e inmunosupresión (Zhang *et al.*, 1997, Rodrigues *et al.*, 2019) y puede generar coinfección junto con VLBE, HVB-1 o VDV (Rola *et al.*, 2005).

O bien, porque el mecanismo inmunomodulador de cada virus para permanecer en el hospedador no afecta la producción de anticuerpos contra el VDV y otros virus debido a que la subpoblación de células B productora de anticuerpos no se altera (Frie *et al.*,

2016) o porque la reactivación espontánea del VLBE tiene mecanismos diferentes que pueden o no coincidir durante su desarrollo con el efecto inmunosupresor de HVB-1 (Jaworski *et al.*, 2019).

Vacunación contra el VDVB y calostrogénesis en hatos coinfectados con VLBE y HVB-1

La obtención de calostro de buena calidad requiere un programa de vacunación muy eficiente. Dado que, las vacunas comerciales no proveen una protección del 100 % y las enfermedades se presentan en el hato de forma dinámica, resulta poco probable vacunar solo animales sanos y sin problemas metabólicos, por lo que, los fracasos esperados durante un programa de vacunación pueden ser mayores. De forma particular, este ensayo incluyó enfermedades endémicas inmunosupresoras que pueden afectar la seroconversión contra el antígeno contenido en la vacuna, pero la seroconversión obtenida fue de 93.75 % (15/16), valor ideal según las instrucciones del fabricante para la vacuna EXPRESS® FP 10-HS utilizada en este ensayo (Boehringer Ingelheim, 2019).

También, es erróneo tratar de establecer el efecto de uno de estos virus sobre la respuesta inmune sin considerar la influencia de alteraciones nutricionales o la presencia de otros agentes infecciosos que causan

inmunosupresión y modifican la calidad del calostro. Este estudio permite sugerir que las vacas coinfectadas, aunque normoglucémicas (Mair *et al.*, 2016) y expuestas a un plan nutricional con alto riesgo para sufrir cetosis subclínica (Iwersen *et al.*, 2013, Oetzel, 2015), tienen la capacidad para seroconvertir contra el VDVB cuando son vacunadas.

En este ensayo, una vaca no seroconvirtió cuando se aplicó una dosis de la vacuna (Cuadro 2). Dado que, no se determinó dependencia para la seroconversión contra el VDVB con respecto al programa de vacunación y es engañoso considerar que el efecto inmunosupresor de los virus explique el evento, el análisis adicional mediante la PCR y secuenciación, permitió establecer una infección persistente con el VDVB-1a (Figura 2, cepa ABART-2). Esta condición genera anergia clonal en el animal infectado (Gómez-Lucía *et al.*, 2006) y unida al principio del ELISA ID Screen® BVD p80 Antibody Competition utilizada en este estudio, no es posible distinguir entre las cepas contenidas en la vacuna asociadas con el VDVB-1a y VDVB-2a (Factor *et al.*, 2016, Irianingsih *et al.*, 2019). Por lo que, la falta de respuesta del sistema inmune contra el VDVB-1a en la vaca con infección persistente y este resultado indican que la anergia clonal para la p80 del virus se extiende también al VDVB-2a.

Virus de la diarrea viral bovina	1-48
NADL (AJ133739)	A G T C G T C A G T G G T T C G A C G C C T T G G A A T A A A G G T C T C G A G A T G C C A C G
Singer (MH133206)
ABART-2
	49-96
NADL (AJ133739)	T G G A C G A G G G C A T G C C C A A A G C A C A T C T T A A C C T G A G C G G G G G T C G C C
Singer (MH133206)
ABART-2
	97-144
NADL (AJ133739)	C A G G T A A A A G C A G T T T T A A C C G A C T G T T A C G A A T A C A G C C T G A T A G G G
Singer (MH133206) C
ABART-2 C G
	145-192
NADL (AJ133739)	T G C T G C A G A G G C C C A C T G T A T T G C T A C T A A A A A T C T C T G C T G T A C A T G
Singer (MH133206) T C
ABART-2 A T C
	193-240
NADL (AJ133739)	G C A C A T G G A G T T G A T C A C A A A T G A A C T T T T A T A C A A A A C A T A C A A A C A
Singer (MH133206) T
ABART-2 T
	241-288
NADL (AJ133739)	A A A A C C C G T C G G G G T G G A G G A A C C T G T T T A T G A T C A G G C A G G T G A T C C
Singer (MH133206) A A
ABART-2 A A
	289-336
NADL (AJ133739)	C T T A T T T G G T G A A A G G G G A G C A G T C C A C C C T C A A T C G A C G C T A A A G C T
Singer (MH133206) T
ABART-2 T
	337-384
NADL (AJ133739)	C C C A C A C A A G A G A G G G G A A C G C G A T G T T C C A A C C A A C T T G G C A T C C T T
Singer (MH133206) T A C T
ABART-2 A T A C T

Figura 2. Comparación de la secuencia parcial de nucleótidos de la región 5'-UTR y poliproteína de la cepa ABART-2 (1194 nucleótidos de longitud, color azul) con cepas representativas del VDVB. Cepa NADL (VDVB-1a no citopático, desde 190nt-1383nt) y cepa Singer (VDVB-1a citopático, desde 191nt-1384nt). Los puntos indican la similitud con la cepa NADL y los nucleótidos en color rojo las regiones polimórficas. La cepa ABART-2 mostró 100 % de similitud con la cepa Singer y 96 % de similitud con la cepa NADL.



- Chamorro, M., P. Walz, D. Haines, T. Passler, T. Earleywine, A. Roberto, R. Palomares, K. Riddell, P. Galik, Y. Zhang, and M. Givens. 2014. 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. *Canadian Journal of Veterinary Research* 78:81-88.
- Chase, C., D.J. Hurley, and A.J. Reber. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 24:87-104.
- Castro, N., J. Capote, R.M. Bruckmaier, and A. Argüello. 2011. Management effects on colostrumgenesis in small ruminants: a review. *Journal of Applied Animal Research* 39 (suppl. 2):85-93.
- Cho, Y.I., and K.J. Yoon. 2014. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science* 15 (suppl. 1):1-17.
- De Paula, M.R., G.S. Slanzon, N. Sobreira, and C.M.M. Bittar. 2019. Passive transfer of immunity in dairy calves with additional consumption of immunoglobulin through colostrum supplement: effects in health and performance. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 20(01-13):e0242019.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, and C.W. Robledo. 2011. InfoStat, versión 2018I, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dunn, A., M. Welsh, A. Gordon, A. Arguello, S.J. Morrison, and B. Earley. 2018. Effect of passive transfer status on response to a glycoprotein E (gE)-negative bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) vaccine and weaning stress in pre-weaned dairy calves. *Journal of Applied Animal Research* 46 (suppl. 1):907-914.
- Factor, C., E. Yus, C. Eiras, M.L. Sanjuan, M. Cerviño, I. Arnaiz, and F.J. Diéguez. 2016. Genetic diversity of bovine viral diarrhea viruses from the Galicia region of Spain. *Veterinary Record Open* 3:e000196.
- Farias, M.V.N., P.A. Lendez, M. Marin, S. Quintana, L. Martínez-Cuesta, M.C. Ceriani, and G.L. Dolcini. 2016. Toll-like receptors, IFN- γ and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Research in Veterinary Science* 107:190-195.
- Frie, M.C., and P.M. Coussens. 2015. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 163:103-114.
- Frie, M.C., K.R. Sporer, J.C. Wallace, R.K. Maes, L.M. Sordillo, P.C. Bartlett, and P.M. Coussens. 2016. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 182:125-135.
- Frie, M.C., K.R. Sporer, O.J. Benitez, J.C. Wallace, C.J. Droscha, P.C. Bartlett, and P.M. Coussens, P.M. 2017. Dairy cows naturally infected with bovine leukemia virus exhibit abnormal B- and T-Cell phenotypes after primary and secondary exposures to keyhole limpet hemocyanin. *Frontiers in Veterinary Science* 4:112.
- Frie, M.C., C.J. Droscha, A.E. Greenlick, and P.M. Coussens. 2018. MicroRNAs encoded by bovine leukemia virus (BLV) are associated with reduced expression of B cell transcriptional regulators in dairy cattle naturally infected with BLV. *Frontiers in Veterinary Science* 4:245.
- Givens, M.D., and B.W. Newcomer. 2017. Does modified-live viral vaccine administration to heifers or cows lack substantial risk? *AABP Proceedings* 50:43-48.
- Glass, E.J., R. Baxter, R.J. Leach, and O.C. Jann. 2012. Genes controlling vaccine responses and disease resistance to respiratory viral pathogens in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148:90-99.
- Gómez-Lucía, E., M.M. Blanco, and A. Doménech. 2006. *Manual de inmunología veterinaria*. Madrid, España, Pearson Educación, S.A., Madrid. 728 p.
- Gutiérrez, S.E., E.N. Esteban, C.M. Lützelshwab, and M.A. Juliarena. 2017. Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection. *INTECH* 6:101-126.
- Irianingsih, S.H., H. Wuryastuty, R. Wasito, H. Wibawa, F.S. Tjatur-Rasa, and B. Poermadjaja. 2019. Genetic analysis of NS5B gene from bovine viral diarrhea virus-infected cattle in Central and East Java, Indonesia. *Veterinary World* 12(7):1108-1115.
- Iwan, E., M. Szczotka, and J. Kocki. 2017. Cytokine profiles of dendritic cells (DCs) during infection with bovine leukaemia virus (BLV). *Polish Journal of Veterinary Sciences* 20 (suppl. 2):221-231.
- Iwersen, M., D. Klein-Jöbstl, M. Pichler, L. Roland, B. Fidschuster, I. Schwendenwein, and M. Drillich. 2013. Comparison of 2 electronic cowside tests to detect subclinical ketosis in dairy cows and the influence of the temperature and type of blood sample on the test results. *Journal of Dairy Science* 96:7719-7730.



- Jaworski, J.P., J.M. Sala, and A. Capozzo. 2018. Short communication: Bovine leukemia virus infection in adult cows does not interfere with foot-and-mouth disease vaccination. *Journal of Dairy Science* 101 (suppl. 12):11247-11250.
- Jaworski, J.P., M.I. Petersen, H.A. Carignano, and K.G. Trono. 2019. Spontaneous virus reactivation in cattle chronically infected with bovine leukemia virus. *BMC Veterinary Research* 15:150.
- Jiménez, C., J.A. Bonilla, G. Dolz, L.R. Rodríguez, L. Herrero, E. Bolaños, M.R. Cortéz, and E. Moreno. 1995. Bovine leukaemia-virus infection in Costa Rica. *Zentralbl Veterinarmed (B)* 42 (suppl. 7):385-390.
- Jones, C. 2019. Bovine herpesvirus 1 counteracts immune responses and immune-surveillance to enhance pathogenesis and virus transmission. *Frontiers in Immunology* 10:1008.
- Juliarena, M.A., C.N. Barrios, C.M. Lützelshwab, E.N. Esteban, and S.E. Gutiérrez. 2017. Bovine leukemia virus: current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment* 9:13-26.
- Kato, H., R. Sato, M. Oonishi, and M. Tajima. 2015. Comparison of vaccination protocols for bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine and Research* 2 (suppl. 5):1034.
- Machado, G., Mendoza, M.R., Corbellini, L.G. 2015. What variables are important in predicting bovine viral diarrhoea virus? A random forest approach. *Veterinary Research* 46:85. doi:10.1186/s13567-015-0219-7
- Mair, B., M. Drillich, D. Klein-Jöbstl, P. Kanz, S. Borchardt, L. Meyer, I. Schwendenwein, and M. Iwersen. 2016. Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. *BMC Veterinary Research* 12:34.
- Maunsell, F. 2014. Cow factors that influence colostrum quality. *WCDS Advances in Dairy Technology* 26:113-121.
- Monteiro, F.L., J.F. Cargnelutti, B. Martins, J.G. Noll, R. Weiblen, and E.F. Flores. 2019. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of panbovine pestivirus primers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 31(2):255-258.
- Morrill, K. 2011. Modifying current laboratory methods for rapid determination of colostral IgG concentration and colostral IgG absorption in the neonate. Theses Ph.D. Ames, Iowa, USA, Iowa State University. 276 p.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2019. NCBI Handout Series-BLAST homepage & search pages-Last Update. Retrieved from file:///C:/Users/PC/Downloads/HowTo_BLASTGuide.pdf
- Nikbakht, G., S. Tabatabaei, S. Lotfollahzadeh, B.N. Fasaie, A. Bahonar, and M. Khormali. 2015. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus 1 and bovine leukaemia virus in Iranian cattle and associations among studied agents. *Journal of Applied Animal Research* 43 (suppl. 1):22-25.
- Oetzel, G.R. 2015. Dairy herd problem investigation strategies: transition cow troubleshooting (en línea, Preconference seminar 7C). University of Wisconsin, School of Veterinary Medicine, 2015 Linden Drive, Madison, WI 53706. <https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/2nutr/ketosis.pdf> (accessed Oct. 20, 2018).
- Pardon, B., K.D. Bleecker, M. Hostens, J. Callens, J. Dewulf, and P. Deprez. 2012. Longitudinal study on morbidity and mortality in white veal calves in Belgium. *BMC Veterinary Research* 8:26.
- Raizman, E.A., R. Pogranichniy, M. Negron, M. Schnur, and D.E. Tobar-Lopez. 2011. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica. *Tropical Animal Health and Production* 43:773-778.
- Reichel, M.P., S.R. Lanyon, and F.I. Hill. 2018. Perspectives on current challenges and opportunities for bovine viral diarrhoea virus eradication in Australia and New Zealand. *Pathogens* 7:14.
- Richter, V., K. Lebl, W. Baumgartner, W. Obritzhauser, A. Käsbohrer, and B. Pinior. 2017. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Veterinary Journal* 220:80-87.
- Rodrigues, A.P.S., A.A. Fonseca Júnior, G.K. Lima, J.M. Bicalho, R.C. Leite, and J.K.P. Reis. 2019. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus (BIV) in bovines from the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 71 (suppl. 2):711-714.
- Rola, M., M.P. Polak, J. Rola, L. Bicka, J.F. Zmudzinski, and J. Kuzmak. 2005. Bovine immunodeficiency virus (BIV) infection in respect to BHV-1, BLV and BVDV coinfections. *Medycyna Weterynaryjna* 61 (suppl. 3):286-289.

- Romero, J.J., G. Dávila, G. Beita, y G. Dolz. 2012. Efecto del estatus serológico al virus de la leucosis enzoótica bovina (BLV) sobre la producción de leche en hatos lecheros de Costa Rica. *Revista Ciencias Veterinarias* 30(2):43-55.
- Romero, J.J., G. Dávila, G. Beita, y G. Dolz. 2015. Relación entre el estado serológico a Leucosis Bovina Enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39 (suppl. 2):7-18.
- Suzuki, S., S. Konnai, T. Okagawa, R. Ikebuchi, A. Nishimori, J. Kohara, C.N. Mingala, S. Murata, and K. Ohashi. 2015. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 163:115-124.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- UNDIVE (Unidad de Diagnóstico e Investigación en Virología Veterinaria). 2020. Oferta de servicios de diagnóstico de infecciones virales en animales domésticos (en línea). Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Disponible en https://www.medvet.una.ac.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=111&Itemid=744
- Walz, P.H., M.D. Givens, S.P. Rodning, K.P. Riddell, B.W. Brodersen, D. Scruggs, T. Short, and D. Grotelueschen. 2017. Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live viral vaccine. *Vaccine* 35:1046-1054.
- Wathes, D.C., C.F. Oguejiofor, C. Thomas, Z. Cheng. 2019. Importance of viral disease in dairy cow fertility. *Engineering* 6(1):26-33.
- Woolums, A.R. 2014. Vaccinating dry cows and calves: with what, when, and is it effective at protecting the calf? *WCDS Advances in Dairy Technology* 26:329-336.
- Zhang, S., C. Wood, W. Xue, S.M. Krukenberg, Q. Chen, and H.C. Minocha. 1997. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4 (suppl. 2):232-235.