



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria (PPFV)**

**Herpesvirus bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección.**

**DMTV. Pablo Gerardo Alonzo Crosa**

(Área de Inmunología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria,  
Universidad de la República, Montevideo-Uruguay)

**TESIS DE MAESTRIA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2010**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria (PPFV)**

**Herpesvirus bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección.**

**DMTV. Pablo Gerardo Alonzo Crosa**

(Área de Inmunología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria,  
Universidad de la República, Montevideo-Uruguay)

**Directora de Tesis: DMV, MSc, MPVM, PhD. Jacqueline Maisonnave**

**TESIS DE MAESTRIA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY**

**2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Las actividades de investigación desarrolladas pudieron ser llevadas a cabo gracias al apoyo brindado por muchos compañeros y amigos que se desempeñan o desempeñaron en diferentes áreas de nuestra Facultad de Veterinaria.

Sin duda el soporte técnico recibido por los docentes del Área de inmunología (Drs. Jacqueline Maisonnave, Martín Breijo, Rodrigo Puentes, Uruguaysito Benavides y Hernan Carol), Reproducción (Drs. Daniel Cavestany y Gonzalo Roses) y Bioestadística (Dr. José Piaggio) fueron pilares fundamentales para apoyar los resultados que hoy estamos presentando.

A todos aquellos que en algún momento brindaron su tiempo para el desarrollo del presente trabajo (Drs. Fernanda Iznardi, Rodrigo García y Guillermo Sanguinetti).

A la Facultad de Veterinaria que puso a disposición su infraestructura (Laboratorios, Campo Experimental de Mígues, vehículos) y recursos humanos (funcionarios y docentes), apostando a la formación de posgrado de sus egresados, la extensión y la investigación aplicada en salud animal.

A los funcionarios del Campo Experimental del Instituto de higiene-Facultad de Medicina donde se realizaron parte de los procedimientos experimentales de la tesis.

A la Dra. Jacqueline Maisonnave quien me abrió las puertas del Área de inmunología donde fue desarrollada esta tesis de postgrado y me sirvió de guía en este proceso de aprendizaje.

A mis padres (Juan Antonio y Norma María) quienes me alentaron constantemente a la superación.

A mi esposa (Marisa) e hijos (Mauro, Bruno y Belén) quienes sin duda me apoyaron con su comprensión y paciencia en el desarrollo de la tesis.

El presente trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), en el marco del proyecto LIA-014 "Evaluación del impacto económico producido en rodeos de cría por la utilización de toros portadores de BoHV-1".

Para todos ellos vaya mi más sincero agradecimiento y reconocimiento.

# INDICE

	<u>Página</u>
<b>1. Introducción</b>	<b>1 a 7</b>
<b>2. Caracterización del Problema</b>	<b>8 a 9</b>
4.1 Objetivos generales	9
4.2 Objetivos particulares (primera parte)	9
4.3 Objetivos particulares (segunda parte)	9
<b>3. Estrategia de la Investigación</b>	<b>10</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>11 a 16</b>
4.1 Materiales y métodos para Objetivo particular 2.2.1	<b>12 a 13</b>
4.2 Materiales y métodos para Objetivo particular 2.2.2	13
4.3 Materiales y métodos para Objetivo particular 2.2.3	13
4.4 Materiales y métodos para Objetivos particulares 2.3.1 y 2.3.2	<b>14 a 16</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>17 a 26</b>
5.1 Resultados de la primera parte	<b>17 a 20</b>
5.2 Resultados de la segunda parte	<b>21 a 26</b>
<b>6. Discusión</b>	<b>27 a 34</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>8. Perspectivas futuras</b>	<b>35</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas</b>	<b>36 a 47</b>

## RESUMEN

La primera etapa del presente trabajo tuvo como objetivo estudiar las posibles causas por las que no se generó respuesta humoral detectable en un toro Limousin del cuál se aisló una cepa de Herpesvirus bovino tipo1 subtipo 1 (BoHV-1.1). La infección latente con BoHV-1 fue confirmada mediante inmunodepresión con corticoides. La inmunogenicidad de esta cepa fue comprobada mediante la infección experimental de terneros. Cinco años post-aislamiento se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 en el toro Limousin y se confirmó la super infección natural con dos subtipos diferentes de BoHV-1.

El objetivo de la segunda etapa fue estudiar la dinámica de la respuesta inmune, la transmisión y el efecto sobre la tasa de preñez (TP), en vacas de carne servidas por monta natural, con toros en diferentes condiciones con respecto a la infección con BoHV-1.1. Se utilizaron 87 vacas y 3 toros distribuidos al azar en 3 grupos. La utilización de un toro seropositivo latentemente infectado no afectó la TP y el virus no fue transmitido a las vacas servidas. El uso de un toro en el periodo agudo de infección ocasionó al comienzo del servicio una diferencia en la TP de 53 % con el grupo control ( $p=0.0001$ ) y el 70 % de las vacas expuestas fueron infectadas. La dinámica de la respuesta humoral fue estudiada durante 338 días, observándose que el 53 % de las vacas infectadas se hicieron seronegativas 2 a 5 meses post-infección. La presencia de bovinos latentemente infectados con BoHV-1 que no poseen niveles de anticuerpos detectables por las técnicas serológicas utilizadas, fue asociada en primera instancia a un problema individual. Los resultados obtenidos, plantean la posibilidad de que esta condición pueda ser encontrada frecuentemente a nivel de campo, lo que constituye un importante riesgo epidemiológico para el control de la enfermedad.

Palabras clave: BoHV-1, respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas.

## SUMMARY

The objective of the first part of this work was to find out the reasons for the lack of detectable antibody response in a Limousin bull from which a bovine herpesvirus type 1 subtype 1 (BoHV-1.1) strain was isolated. The latency of the virus was confirmed by immunodepressing the animal. The immunogenicity of this strain was confirmed by experimental infection of calves. Five years post-isolation anti-BoHV-1 antibodies were detected and a super natural infection with two different subtypes of BoHV-1 was confirmed.

The objective of the second part was to study the dynamics of the immune response, transmission and effect on pregnancy rate (PR) of beef cows bred by bulls in different conditions with respect to BoHV-1.1 infection. Eighty seven cows and 3 bulls randomly assigned into 3 groups were used. The use of a seropositive latently infected bull had no effect on the PR and the virus was not transmitted to the cows. The use of a bull with an acute infection made the PR be 53% lower than the one of the control group ( $p=0.0001$ ) and 70% of the cows were infected. The dynamics of the humoral response was studied during 338 days, observing that 53% of infected cows became seronegative 2 to 5 months post-infection. The existence of cattle latently infected with levels of non detectable BoHV-1 antibodies was at the beginning associated to an individual problem. The results obtained in the present study suggest that this condition may often be found and it is an important epidemiological risk for disease control.

Keywords: BoHV-1, immune response, transmission and reproductive losses.

# 1. INTRODUCCIÓN

El Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) es el agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) enfermedad contagiosa de distribución mundial (Lemaire et al. 1994). Pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Fenner et al. 1993; Davison. 2002). El ácido desoxirribonucleico (ADN) que compone el genoma de BoHV-1 está compuesto por 136 kilobases (Kb) y posee al menos 10 genes con potencial para codificar glicoproteínas (gp) que tienen un rol fundamental en la patogenicidad por mediar la entrada, fusión y dispersión del virus en las células del huésped. (Schwyzer & Ackerman 1996). La infección con BoHV-1 puede ocasionar diferentes formas clínicas caracterizadas por enfermedad respiratoria, nerviosa y reproductiva (infertilidad, abortos), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y Balanopostitis Pustular Infecciosa (IBP) (Huck et al. 1973; Kahrs. 1977; Tikoo et al. 1995).

Basados en los distintos síndromes clínicos observados y al análisis del ADN viral con enzimas de restricción (REA) Misra et al. (1983) clasificaron este virus en tipo I (asociado a IBR o abortos), tipo II (asociado a abortos e IPV) y tipo III (asociado a IPV). Metzler et al. (1985) incluyó cepas asociadas a encefalitis y basado en el análisis de péptidos, por anticuerpos monoclonales y por REA propuso una clasificación en cuatro subtipos (BoHV-1.1, BoHV-1.2a, BoHV-1.2b y BoHV.1.3). Este último subtipo posee características biológicas y patogénicas similares a BoHV-1.1 y 1.2 (Meyer et al. 2001) pero fue reclasificado y actualmente se conoce como BoHV-5 (Roizman et al. 1992).

La infección con BoHV-1.1 clínicamente puede cursar con síntomas respiratorios, nerviosos (Penny et al. 2002), conjuntivitis, patología reproductiva (endometritis y abortos) (Wentink GH. et al.1993, Elazhary M. et al.1980) y lesiones vesiculares en ubre (Guy et al. 1984). Si bien no se ha observado alta mortalidad su importancia radica en las pérdidas económicas por abortos, pérdidas de neonatos, caída en la producción lechera y complicaciones por enfermedades bacterianas secundarias (Miller J.1991). El cuadro clínico respiratorio que producen los subtipos 1.1 y 1.2a es indistinguible (Spilki et al. 2004) y ambos producen abortos, sin embargo la infección con 1.2b no produce abortos (Miller et al. 1991; Van Oirschot 1995).

El primer aislamiento de BoHV-1 fue realizado por Madin et al. (1956) a partir de un brote de enfermedad respiratoria caracterizado por fiebre, corrimiento nasal y ocular, tos, rinitis y traqueítis. En Uruguay, el BoHV-1 fue aislado de un bovino seropositivo y clínicamente sano luego de la administración de corticoides (Guarino et al. 1982) y posteriormente Rivero et al. (1987) describieron un caso de Granuloma nasal en bovinos, con alta morbilidad en el cual se logró aislar el BoHV-1, pero ninguno de estos aislamientos fue caracterizado. En el año 1999 el subtipo 1.1 fue aislado de un ternero con sintomatología nerviosa al que no se le detectaron anticuerpos anti-BoHV postinfección (Alonzo et al. 2002). En los años 2002 y 2004 otras dos cepas de BoHV-1 fueron aisladas y caracterizadas como pertenecientes al subtipo 1.2 (Puentes et al. 2007). Estos subtipos también han sido aislados y caracterizados en Argentina y Brasil (Weiblen et al. 1992; Pidone et al. 1999a; D'Arce et al. 2002). En Uruguay, Easton (2006) demostró que de un total de 431 fetos remitidos entre los años 2002-2005 para diagnóstico de aborto, el 1% fue debido a infección por BoHV-1.

La detección de anticuerpos en suero o leche se ha utilizado para determinar la presencia y distribución de la enfermedad en la mayoría de los países de la región y del mundo y la prevalencia serológica varía entre 36 y 83 % (Ackerman et al. 1990a; Durham et al. 1991; Paton et al. 1998; Motha & Hansen 1998; Pidone et al. 1999b; Obando et al. 1999a; Cerqueira et al. 2000; Odeon et al. 2000; Rocha et al. 2001; Stahl et al. 2002; Vieira et al. 2003). Del mismo modo, trabajos realizados en Argentina utilizando fluidos de fetos abortados han reportado una prevalencia de anticuerpos anti-BoHV-1 que oscilaron según los autores entre 1.2 % (Pinto et al. 1993) y 30.5 % (Moore et al. 2003).

En Uruguay la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida. Saizar (1997) encontró un 45-48 % de reactores positivos por la técnica de enzimo inmunoensayo (ELISA) para detección de anticuerpos en suero de ganado de carne y leche respectivamente. Posteriormente un muestreo aleatorio realizado en ganado de carne a nivel nacional encontró que 99.1% de los establecimientos ganaderos posee al menos un animal positivo y la prevalencia serológica fue estimada en 36.6% (Repiso et al. 2005; Guarino et al. 2008).

La infección natural con BoHV-1 ocurre por entrada del virus a través de las vías aéreas generalmente por aerosoles o por contacto directo con secreciones nasales u oculares (Engels & Ackermann. 1996). La transmisión del virus a otros bovinos por vía aerógena ha sido demostrada de forma experimental y natural (Mars et al. 1999; Mars et al. 2000). La infección genital ocurre por contacto directo o a través de semen contaminado (Snowdon 1965; Huck et al. 1971; Deas & Johnston. 1973; Parsonson & Snowdon, 1975; Dennet et al. 1976; Kupfershmid et al. 1986). La transmisión indirecta puede ocurrir por agua, alimentos o fomites contaminados (Tikoo et al. 1995). La inactivación del virus en el ambiente varía según la temperatura, pH, luz, y humedad. En ambientes cálidos puede permanecer infectante por 5 a 13 días y si la humedad es menor al 90% la capacidad infectante disminuye. El BoHV-1 es sensible a desinfectantes derivados del fenol, amonios cuaternarios y formaldehído (Wentink et al. 1993).

En condiciones naturales el bovino es el principal reservorio y fuente de infección del virus. Sin embargo, ovinos, caprinos, cerdos y animales silvestres han sido infectados experimentalmente sugiriéndose su participación en la epidemiología de la enfermedad (Kahrs 1977).

El BoHV-1 sobrevive en la naturaleza por dos eventos fundamentales, la infección de la población de bovinos susceptibles y la inducción de latencia en los mismos. La latencia viral es definida como la persistencia, en el organismo del huésped, del genoma viral en ausencia de virus infeccioso (Pastoret & Thiry 1985). Los bovinos latentemente infectados (asintomáticos) constituyen el reservorio más importante, ya que pueden excretar el virus de forma intermitente y transmitirlo a bovinos sanos durante varios años (Engels & Ackermann 1996; Turín et al. 1999). Este fenómeno juega un importante papel en el potencial patogénico de los Herpesvirus y deriva de una interacción compleja con el huésped en la que intervienen numerosos factores celulares, aunque también se ha demostrado que existen genes específicos que controlan esta propiedad viral (Jones 2003).

Durante la infección primaria aguda el virus es excretado por las secreciones nasales durante un período de 10 a 17 días, los títulos más altos se producen 4 a 6



días post infección (pi) (Wentink et al. 1993). La dosis necesaria para infectar un animal ha sido poco documentada, y depende de las condiciones ambientales, la vía de infección y la virulencia de la cepa (Tikoo et al. 1995). Se han descrito diferencias en la virulencia de las cepas de BoHV-1.1 y es por eso que el cuadro clínico puede ir desde una débil o inexistente manifestación clínica hasta la muerte (Kaashoek et al. 1996).

Luego de la infección primaria el virus puede quedar restringido a un área local o distribuirse en órganos alejados de la puerta de entrada por viremia o a través de los axones de neuronas a ganglios nerviosos regionales o al sistema nervioso (Pastoret et al. 1982; Engels & Ackermann. 1996).

El BoHV-1 se ha aislado e identificado luego de una infección primaria en ganglios nerviosos y tejidos linfoides regionales de la puerta de entrada (Ackermann & Wyler. 1984; Winkler et al. 2000; Vogel et al. 2004). Luego de la infección por vía aérea las neuronas del ganglio trigémino son uno de los principales lugares donde el virus permanece en forma latente, ya que BoHV-1 se ha aislado e identificado de animales clínicamente sanos e infectados experimentalmente por esta vía (Homan et al. 1980; Ackermann et al. 1982; Rodríguez et al. 1984). Cuando la infección es por vía prepucial, BoHV-1 permanece en forma latente fundamentalmente en los ganglios sacros, lumbares y los últimos dorsales (Van der Engelenburg et al. 1995; Esteves et al. 2003).

El BoHV-1 puede ser reactivado y excretado bajo condiciones de estrés natural, transporte (Thiry et al. 1987) o inmunodepresión con corticoides (Darcel & Dorward. 1975; Sheffy & Rodman. 1973; Pastoret et al. 1979; Castrucci et al. 1980; Narita et al. 1981; Jones et al. 2000; Vogel et al. 2003; Grom et al. 2006). Los altos niveles de corticoides presentes al momento del parto podrían actuar como un factor que desencadena la reactivación viral (Snowdon 1965). Esto, es discutido por los resultados obtenidos por Thiry et al. 1984, quienes no lograron aislar virus en secreciones de vacas infectadas con BoHV-1 al momento del parto.

Cuando la infección primaria se produce por vía respiratoria el virus es usualmente excretado por secreciones nasales y oculares (Rossi et al. 1982), sin embargo cuando se produce viremia puede excretarse también por secreciones vaginales o por semen (Van Oirschot 1995). La excreción de forma intermitente a lo largo de periodos prolongados ha sido demostrada en bovinos infectados por diferentes vías de entrada (Snowdon 1965). Si la infección fue vía venérea, el virus puede excretarse en forma intermitente por la mucosa prepucial hasta 6 periodos en un año y la cantidad de virus excretado durante la reactivación es menor que durante la infección primaria. (Van Oirschot 1995). El plasma seminal o semen puede contener BoHV-1 por la replicación del virus en la mucosa de pene, prepucio y probablemente en la parte distal de la uretra y puede ser excretado por días o semanas (Snowdon W.1965).

La acción del sistema inmune frente a la infección con BoHV-1 incluye las respuestas de tipo Th1 y Th2. En la infección primaria los anticuerpos tienen menor importancia que la inmunidad celular mediada por linfocitos TCD8+, pero son clave en las infecciones secundarias y en la reactivación ya que neutralizan virus y previenen la dispersión de la infección (Babiuk et al. 1996). Cuando hay re-activación viral, la inmunidad humoral específica, ejerce control de la viremia, pudiendo evitar la re-

excreción y diseminación del virus (Lemaire et al. 1994). Sin embargo, Van Oirschot et al. 1993 demostraron que toros de centros de inseminación sin alteraciones clínicas, excretan BoHV-1 por semen de forma intermitente durante muchos meses, aun teniendo importantes títulos de anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos específicos normalmente son detectados 7 a 10 días post-infección, los isotipos de inmunoglobulinas M (IgM) y G (IgG) llegan a su título máximo a los 14 y 35 días luego de la infección primaria respectivamente. El isotipo de IgG presente en la infección primaria es la IgG1 y en la secundaria la IgG2 es la responsable del aumento significativo en los niveles de anticuerpos (Guy & Potgieter. 1985a). Durante la reactivación viral utilizando corticoides el tipo de isotipo de IgG predominante es similar a la presente en una infección secundaria (Guy & Potgieter. 1985b). Luego de la infección con BoHV-1 vía genital se ha documentado que la respuesta inmune estimulada puede ser leve e inducir bajo título de anticuerpos o que estos no sean detectados (Huck et al. 1971; Deas & Johnston. 1973; Van Oirschot 1995).

En infecciones secundarias los anticuerpos presentes no son capaces de impedir que se establezca latencia con una nueva cepa de campo o vacunal (Lemaire et al. 1994). En un mismo animal, se ha demostrado la superinfección con diferentes cepas de un mismo subtipo o subtipos diferentes (Whetstone & Miller. 1989; Maisonnave et al. 2005). Cuando estos bovinos son inmunodeprimidos con corticoides, hay reactivación viral, ambas cepas pueden ser reaisladas y se evidencian cambios en el genoma que demuestran la recombinación de segmentos del genoma viral entre diferentes cepas de un mismo subtipo (intraespecífica) (Whetstone et al. 1989a; Whetstone et al. 1989b). La recombinación interespecífica (entre diferentes tipos de Alfa herpesvirus) también ha sido demostrada (Schyns et al. 2003; Meurens et al. 2004a; Meurens et al. 2004b). Este es un mecanismo evolutivo de los Alfa herpesvirus que puede generar nuevas cepas o inducir modificaciones en la virulencia de las mismas (Henderson et al. 1990; Katz et al. 1990; Thiry et al. 2006).

La presencia de anticuerpos calostrales no impide la replicación viral y el establecimiento de latencia e interfieren con la inducción de una respuesta humoral activa tanto en animales infectados naturalmente como en aquellos inmunizados con vacunas a virus vivo modificado (Brar et al. 1978; Menanteau-Horta et al. 1985; Lemaire et al. 1995; Fulton et al. 2004). Utilizando cepas de campo y vacunas a virus vivo modificado se ha logrado experimentalmente generar portadores latentemente infectados con BoHV-1 y serológicamente negativos en terneros que poseían altos niveles de anticuerpos calostrales al momento de la infección (Lemaire et al. 2000a; Lemaire et al. 2000b). Sin embargo, en estos animales se detectaban anticuerpos y respuesta celular específica a BoHV-1 luego de infecciones secundarias e inmunodepresión con glucocorticoides (Lemaire et al. 2000a). Se considera que estos animales constituyen un riesgo para el control de la enfermedad dentro de un rodeo o un país (Lemaire et al. 2000b).

El BoHV-1.1 se replica en embriones bovinos (blastocitos) y puede ocasionar muerte embrionaria (Bowen et al. 1985; Vanroose et al. 2000). La sobrevivencia de embriones mantenidos *in vitro* se afecta notoriamente solo en aquellos que no poseen zona pelúcida (Bielanski et al. 1987). Estudios posteriores *in vivo* demostraron que la transferencia embrionaria también puede ser una posible vía de

transmisión de la enfermedad. La proporción de blastocitos que se recuperan de vaquillonas infectadas experimentalmente con BoHV-1 disminuye y el virus puede ser aislado en embriones viables y fluidos fetales (Bielansky & Dubuc. 1994).

Los abortos han sido comprobados natural y experimentalmente luego de la infección con BoHV-1 en cualquier momento de la gestación. La sucesión de eventos que se dan previo al aborto son la infección de la madre, viremia, infección placentaria, infección fetal y muerte (Kendrick. 1973). Las alteraciones patológicas más importantes en fetos son focos de necrosis coagulativa en hígado, bazo y riñón e infiltrado mononuclear en pulmón y sistema nervioso (Owen et al. 1964; Easton. 2006). El virus también ha sido aislado e identificado en la placenta de fetos abortados luego de la infección con BoHV-1 y las lesiones reportadas van desde una leve placentitis hasta lesiones necróticas con presencia de células inflamatorias (Kendrick & Straub. 1967; Kendrick et al. 1971; Rodger et al. 2007).

La infección con BoHV-1 durante la monta natural de hembras bovinas no parece afectar la fertilidad (Parsonson & Snowdon, 1975). Sin embargo, otros autores han señalado problemas de fertilidad en rodeos seropositivos que han utilizado toros de los cuales se ha aislado BoHV-1 en semen (Elazhary et al. 1980; Biuk-Rudan et al. 1999). La inseminación artificial con semen contaminado y la inmunización con vacunas a virus vivo modificado utilizadas durante el estro produce una baja tasa de concepción (White & Snowdon. 1973; Parsonson & Snowdon. 1975; Chiang et al. 1990).

La infección intrauterina de vaquillonas provoca endometritis aguda, ooforitis y necrosis difusa a nivel de cuerpo lúteo y folículos (Miller & Van Der Maaten. 1984). También pudo determinarse infertilidad y lesiones similares a las anteriormente descritas luego de la inoculación intravenosa con vacunas vivas durante el estro (Van Der Maaten & Miller. 1984; Van Der Maaten et al. 1985; Miller et al. 1989; Smith et al. 1990). Las alteraciones patológicas a nivel del ovario tienen un marcado efecto sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo. Los niveles de progesterona disminuyen en sangre durante la fase luteal que se produce en la infección primaria y en el siguiente ciclo estral (Miller & Van Der Maaten. 1985).

Miller & Van Der Maaten. (1986) demostraron que la mortalidad embrionaria observada luego de la infección primaria con BoHV-1.1 se produce fundamentalmente en las tres primeras semanas de gestación y se debe a la infección del embrión o a las alteraciones secundarias (disminución de los niveles de progesterona) a la necrosis luteal ocasionada por el proceso inflamatorio a nivel de ovario. El virus fue aislado de ovario, infundíbulo, útero y glándulas adrenales en hembras sacrificadas luego del tratamiento con corticoides (Miller & Van Der Maaten. 1987).

La performance reproductiva, en hembras dadoras de embriones y serologicamente positivas no se vio afectada (Castro et al. 1991; Bielansky & Dubuc. 1994). En este mismo sentido Del Fava (2001) estudió los índices reproductivos y el desempeño productivo de vacas seropositivas a BoHV-1 sin historia de vacunación, encontrando que tanto la fertilidad como el porcentaje de parición, no estaban influenciados por esta condición. Estos hallazgos sugieren que la performance reproductiva no es afectada en hembras latentemente infectadas con BoHV-1.

La detección de anticuerpos específicos con técnicas serológicas es utilizada para realizar estudios epidemiológicos, evaluar la respuesta a vacunas comerciales y para el diagnóstico de infecciones con BoHV-1 (Van Donkersgoed et al. 1991; Fulton et al. 1995; Obando et al. 1999b; Descoteaux et al. 2003). La sero-neutralización (SN) *in vitro* y el ELISA son las técnicas serológicas más utilizadas (Pidone et al. 1999b). En relación a la SN *in vitro* han sido desarrolladas diferentes variantes y según el protocolo utilizado la sensibilidad (S) y la especificidad (E) pueden variar (Edwards et al. 1986; Deregt et al. 1993; Perrin et al. 1993). El ELISA es un inmunoensayo relativamente rápido, con muy buena S y E (Perrin et al. 1993; Kramps et al. 1994; De Wit et al. 1998; Graham et al. 1998; Sarca et al. 1998; Cho et al. 2002). Sin embargo, la S varía de 50 a 100 % según el *kit* utilizado, por lo tanto es necesario estandarizar mediante sueros patrones las diferentes técnicas de ELISA comerciales disponibles (Kramps et al. 1993). Cuando se comparan ambas técnicas de diagnóstico la concordancia es alta, pero los resultados de S y E relativa a la SN *in vitro* son variables (Medici et al. 2000; Cortez et al. 2001).

La técnica de linfoproliferación *in vitro* (LP) puede utilizarse para evaluar respuesta inmune celular específica a BoHV-1 y memoria inmunológica en animales infectados, luego de la inmunodepresión experimental o vacunación reciente (Hutchings et al. 1990, Denis et al. 1994; Gupta et al. 2001). A los 5 días pi se detectan niveles de proliferación específicos y el pico se produce a los 7 a 10 días (Rouse & Babiuk. 1974). Sin embargo, otros autores, utilizando virus vivo o inactivado para la estimulación, obtienen resultados contradictorios con esta técnica (Rutten et al. 1990; Wentink et al. 1990). Esto es atribuido, a disminución de la viabilidad de los monocitos a través de la inducción de apoptosis tanto por el virus vivo como inactivado (Hanon et al. 1996; Renjifo et al. 1999).

El diagnóstico etiológico definitivo de la enfermedad puede ser realizado mediante aislamiento viral o mediante la detección de antígenos y/o ADN de BoHV-1 (Ramneek et al. 2005). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica ampliamente utilizada hoy en día para detectar ADN viral y posee una mayor S y rapidez que el aislamiento viral en cultivos celulares (Van der Engelenburg et al. 1993; Van der Engelenburg et al. 1995; Van Oirschot et al. 1995; Xia et al. 1995a; Xia et al. 1995b; Rocha et al. 1998; Deka et al. 2005). Sin embargo, hay muestras que son detectadas por aislamiento viral y resultan negativas por PCR (Wagter et al. 1996).

Para el control y erradicación de la enfermedad se han descrito varios métodos. En países o regiones con baja prevalencia serológica la erradicación es viable eliminando los animales seropositivos (Ackermann & Engels. 2006). En los países donde la prevalencia es alta, la erradicación es difícil y la enfermedad debe ser controlada con la utilización de vacunas, el uso de toros no portadores del virus y medidas de manejo que ayuden a prevenir el estrés y la transmisión del agente (Lemaire et al. 1994). Las vacunas inactivadas, atenuadas o diferenciales (DIVA) son utilizadas actualmente en la mayoría de los países (Pospisil et al. 1996; Strube et al. 1996; Van Oirschot 1999; Lehmann et al. 2002; Zimmermann et al. 2007). Estas últimas, se utilizan asociadas a técnicas que detectan anticuerpos específicos contra una determinada gp viral, que esta deletada en la vacuna y por lo tanto permiten diferenciar animales infectados de vacunados (Henderson. 2005). La mayoría de las vacunas desarrolladas hasta el momento, son eficaces en reducir los síntomas

clínicos, la replicación viral pi y la transmisión a nivel de campo, pero no evitan la infección y el establecimiento de latencia (Van Drunen Littel-van der Hurk. 2006).

Los programas de control y vigilancia están orientados a evitar el ingreso de animales o productos que puedan vehicular el virus y detectar a tiempo la reintroducción del agente en los predios libres para evitar la difusión de la enfermedad. Esto se basa en que el ingreso de bovinos comprados o que regresan de lugares de concentración, la presencia de toros adultos, el estrecho contacto directo, y las visitas frecuentes son los factores de manejo más comúnmente asociados con una alta prevalencia serológica. La superpoblación, el movimiento y la exposición a altas temperaturas son los factores más comúnmente asociados con el riesgo de reactivación y excreción de BoHV-1 (Van Schaik et al. 1999; Hage et al. 2003; Boelaert et al. 2005; Nardelli et al. 2008). Por lo tanto, estos factores deben ser evaluados de forma continua para promover modificaciones a tiempo en los planes de control y prevención, ya que modifican el riesgo de ingreso y diseminación del virus dentro de la población. (Graat et al. 2001).

Algunos países como Austria, Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suiza y Suecia pudieron erradicar la enfermedad pero los costos para lograrlo y mantener esta condición son elevados (Ackermann et al. 1990b; Ackermann & Engels. 2006; Nuotio et al. 2007). No obstante, se ha comunicado la reintroducción del virus a países como Dinamarca o predios de Inglaterra que habían logrado el estado de libre (Nylín et al. 1998; Pritchard et al. 2003).

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

El principal antecedente que da origen al desarrollo de la primera parte del presente trabajo es la ausencia de anticuerpos anti-BoHV-1 en un toro Limousin con sintomatología clínica de Rinotraqueítis infecciosa Bovina (IBR) y del cuál fue aislada una cepa autóctona (Uy-1999) de BoHV-1.1, a partir de secreciones nasales y oculares (Alonzo et al. 2002).

Si bien existen reportes de baja o nula respuesta humoral luego de la infección vía genital con BoHV-1 (Huck et al. 1971; Deas & Johnston 1973), este hecho no es común cuando la infección es por vía aérea y generalmente los anticuerpos aparecen en niveles detectables a los 7 a 10 días pi (Guy & Potgieter 1985a). Las diferencias en la inmunogenicidad de las cepas de BoHV-1, en la dosis infectante y en la vía de infección, han sido reportadas también como causas de una baja respuesta humoral (Kaashoek et al. 1996; Van Oirschot 1995). Si la infección natural o experimental se produce cuando aún existen anticuerpos calostrales, los bovinos pueden ser serologicamente negativos pero portadores de BoHV-1.1. Luego de una infección secundaria o inmunodepresión con corticoides, estos bovinos, desarrollan anticuerpos y respuesta celular específica anti-BoHV-1 (Lemaire et al. 1995; Lemaire et al. 2000a; Lemaire et al. 2000b).

Basados en estos antecedentes, en la primera parte de la tesis se planteó una hipótesis para tratar de explicar la razón por la cuál no se detectaron anticuerpos pi contra BoHV-1 en el toro Limousin del cuál se aisló la cepa Uy-1999.

Si este toro se encontraba latentemente infectado con BoHV-1 y permanecía sin respuesta humoral detectable por las técnicas serológicas actualmente utilizadas, podría ser un riesgo para la transmisión del virus a bovinos susceptibles. La importancia de este hallazgo radica en que si esto no es un fenómeno individual, los bovinos con estas características serían una dificultad para la implementación de planes de control o erradicación de la enfermedad.

En el año 2004, luego de permanecer seronegativo por cinco años (1999-2004), se detectaron anticuerpos anti-BoHV con las mismas técnicas utilizadas anteriormente. La respuesta detectada puede haber sido inducida por la reactivación del virus latente o por una superinfección con una cepa de campo como han descrito Babiuk et al. (1996). La superinfección experimental ha sido descrita por Whestone & Miller (1989), sin embargo en condiciones naturales esto no ha sido reportado.

En la segunda etapa de la tesis se buscó generar información sobre la transmisión viral y el efecto sobre la tasa de preñez (TP) cuando se utilizan para el servicio por monta natural toros en diferentes condiciones con respecto a la infección con BoHV-1.1.

En Uruguay así como en la mayoría de los países del mundo la infección con BoHV-1.1 esta ampliamente distribuida. Repiso et al. (2005) reportan que la prevalencia serológica por categorías en nuestro país es de un 11% en vaquillonas, 44% en vacas y un 87% en toros. En base a estos resultados, se identifica la época de servicio como un evento importante para la transmisión del virus a nivel de rodeos de cría. Los toros tendrían un papel central en la diseminación de la enfermedad, ya

que son la categoría de más alta seroprevalencia y pueden excretar el virus y transmitirlo a otros bovinos.

Existen trabajos previos que han valorado la transmisión del virus en el momento del servicio y el efecto de la infección sobre la tasa de preñez (TP) en vacas. Sin embargo, los resultados son contradictorios y han sido realizados en condiciones experimentales que no permiten extrapolar los resultados obtenidos a nuestros sistemas productivos (Parsonson & Snowdon, 1975, Elazhary et al. 1980; Biuk-Rudan et al. 1999).

El seguimiento de la evolución de los anticuerpos en animales infectados en condiciones similares a las que se pueden dar a nivel de campo, proporcionará información que ayudará a comprender la dinámica de la transmisión y la respuesta inmune humoral postinfección con BoHV-1.1.

Estudiar el efecto de la infección con BoHV-1.1 sobre la tasa de preñez, en condiciones similares a las que se realiza el servicio en nuestros sistemas productivos, ayudará a comprender el impacto de esta enfermedad en nuestro sistema de cría.

## **2.1 OBJETIVOS GENERALES**

2.1.1 Estudiar las posibles causas por las que no se generó una respuesta humoral detectable en un bovino del cuál se aisló una cepa de BoHV-1.1.

2.1.2 Generar información sobre la dinámica de la transmisión de BoHV-1.1 y el impacto que tiene esta enfermedad sobre la tasa de preñez en condiciones de campo.

## **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES (PRIMERA PARTE)**

2.2.1 Estudiar la inmunogenicidad de la cepa Uy-1999.

2.2.2 Evaluar si el toro Limousin se encontraba latentemente infectado con BoHV-1.

2.2.3 Determinar si los anticuerpos anti-BoHV detectados en el 2004, fueron inducidos por la reactivación de la cepa Uy-1999.

## **2.3 OBJETIVOS PARTICULARES (SEGUNDA PARTE)**

2.3.1 Evaluar la dinámica de la transmisión viral y la respuesta humoral en vacas de cría infectadas en condiciones de campo con BoHV-1.1.

2.3.2 Determinar si la realización del servicio con toros infectados con BoHV-1.1, afecta la tasa de preñez en vacas de cría seronegativas.

### 3. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La hipótesis planteada para explicar la ausencia de la respuesta humoral en el bovino del cual se aisló la cepa Uy-1999 luego de haber presentado sintomatología característica de la enfermedad, fue que esta cepa era poco inmunogénica para los bovinos y pi no indujo una respuesta de anticuerpos detectable. Para resolverla, la estrategia utilizada fue evaluar la inmunogenicidad (objetivo particular 2.2.1) realizando la infección experimental de bovinos con la cepa Uy-1999. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia Los Angeles (LA). Se evaluó la excreción viral y la respuesta humoral pi con ambas cepas de BoHV-1.1.

La segunda hipótesis planteada en la primera parte del trabajo fue que luego del aislamiento de la cepa Uy-1999 el toro limousin permaneció latentemente infectado con BoHV-1. Para resolverla, se realizó un protocolo de inmunodepresión con corticoides con la finalidad de reaislar el virus (objetivo particular 2.2.2).

La tercera hipótesis planteada fue que los anticuerpos detectados en el año 2004 se indujeron por la reactivación de la cepa Uy-1999 o por una superinfección con otra cepa de campo. Para estudiar esta posible hipótesis se utilizó nuevamente un protocolo de inmunodepresión con corticoides con la finalidad de reaislar el virus para luego caracterizarlo (objetivo particular 2.2.3).

En la segunda etapa de la tesis se trabajó para generar información sobre la transmisión viral y el efecto de la infección con BoHV-1 sobre la respuesta humoral y la tasa de preñez (TP) en un rodeo de vacas con biotipo carnívor servido por monta natural.

La cuarta hipótesis plantea que la utilización de toros latentemente infectados o con infección aguda por BoHV-1.1, provoca la transmisión del virus a vacas de cría durante el servicio y puede afectar la TP. La estrategia empleada fue la realización del servicio por monta natural en vacas seronegativas a BoHV-1, utilizando toros en diferentes condiciones con respecto a la infección con BoHV-1.1 (infectado latentemente= seropositivo a BoHV-1 e infectado agudo= infectado al comenzar el servicio). Se trabajó con un modelo experimental a campo que buscó reproducir las condiciones en las que se realiza el servicio en los rodeos de cría en la mayor parte de nuestro país. Se evaluó si los toros infectados con BoHV-1.1 son capaces de excretar el virus en cantidad suficiente como para infectar y generar respuesta humoral en las vacas (objetivo particular 2.3.1). La detección de anticuerpos anti-BoHV-1 se utilizó como indicador de infección.

La dinámica de la respuesta humoral en las vacas que se infectaron (seropositivas), fue estudiada mediante muestreos periódicos de todos los bovinos del ensayo. La evolución de la TP durante el ensayo fue evaluada mediante ecografía y palpación rectal (objetivo particular 2.3.2). Un toro seronegativo trabajó en las mismas condiciones con un grupo de vacas seronegativas y fue utilizado como control negativo.



#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS (M&M)

Cultivo de células: Para la propagación viral, aislamiento y la técnica de Seroneutralización (SN) *in vitro* se utilizó la línea celular de riñón bovino *Madin Darby bovine kidney* (MDBK) libre del Virus de Diarrea Viral Bovina (BVDV), procedente de American Type Culture Collection. Los cultivos fueron mantenidos en botellas de vidrio con Medio Eagle Modificado (MEM), 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino irradiado (SFB) (GIBCO).

Virus: Se utilizaron dos cepas de BoHV-1.1: la cepa de referencia Los Angeles (LA) proporcionada por el Dr. Dubovi de la Universidad de Cornell-USA y la cepa Uy-1999 aislada y caracterizada en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Veterinaria-U de la R (Alonzo et al. 2002). La titulación viral se realizó en microplacas de 96 pozos (NUNC) por el método de Dosis Infeccionante de Cultivo Celular 50 (DICC<sub>50</sub>) y el título viral se calculó según el método de Reed & Muench (1938). El stock de cepas fue conservado a - 80 °C.

Aislamiento viral: Se utilizó protocolo descrito en Manual de Standards para Test Diagnósticos y Vacunas de OIE (2000). Las placas de 24 pozos (NUNC) fueron sembradas con 100.000 células/pozo y cuando la monocapa celular tuvo un 90 % de confluencia, fue inoculada con el sobrenadante de hisopados o líquido seminal dejándose en adsorción por 90 minutos a 37 °C. Se extrajo el inóculo y se agregaron 2 ml/pozo de Minimum Essential Medium (MEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 6 a 7 días. Se realizaron observaciones diarias buscando la presencia del efecto citopático (ECP) característico de BoHV. Las muestras que no presentaban ECP se sometieron a tres pases ciegos antes de dar como negativa la muestra. En cada placa se incluyeron un control negativo (células + MEM) y uno positivo (células + sobrenadante de células infectadas con la cepa LA).

Identificación viral: Para identificar los aislamientos realizados se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia directa (IFD) con un anticuerpo policlonal anti-BoHV-1 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (VMRD-USA). Las células con ECP característico de BoHV-1 se colocaron en portaobjetos, se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas y se fijaron durante 10 minutos en acetona a - 20 °C. Las láminas luego de hidratadas y secas, se incubaron con el anticuerpo conjugado durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, se lavaron y se montaron para luego observarse al microscopio de luz ultravioleta.

Serología: Se utilizó la técnica de SN *in Vitro*, virus fijo-suero variable (House & Baker 1971) para determinar anticuerpos neutralizantes anti-BoHV. Los sueros fueron evaluados por duplicado utilizando diluciones crecientes en base doble e incubados en microplacas de 96 pozos (NUNC) por 1 hora a 37 °C con 100 DICC<sub>50</sub> de BoHV-1.1. Seguidamente 30.000 células fueron agregadas por pozo y las placas fueron incubadas (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>) por 5 días. En cada placa se realizaron controles de crecimiento celular, toxicidad del suero y sueros de referencia positivo y negativo (cedidos por el Dr. Weiblen de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Santa María-Brasil) fueron adicionados en cada placa. El título de anticuerpos seroneutralizantes (Título SN) se calculó por el método de punto final 50 (House & Baker 1971) y se

expresó como el recíproco de la mayor dilución de suero que neutralizó al virus y fue capaz de inhibir la aparición del ECP en el 50% de los pocillos.

Respuesta inmune celular: Fue valorada por la técnica de Linfoproliferación *in vitro* (LP) según fue descrita por Rouse & Babiuk. (1974). Se extrajo sangre con un 10 % de Citrato de Na y se centrifugó a 4 °C y 600 g por 30 minutos. La capa flogística fue separada y colocada en Ficoll 1083 (Histopaque-SIGMA) para la separación de los linfocitos por gradiente de densidad. Se centrifugó a 450 g por 30 minutos, se lavó con MEM y se mantuvieron con solución de congelamiento (90% de SFB descomplementado y 10% de Di-metil Sulfóxido-SIGMA) en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso. Para la LP los linfocitos fueron descongelados y colocados en placas de 96 con fondo en U (NUNC) (350.000 /pozo/100 µl de MEM con 10% de SFB descomplementado). Tres pocillos se estimularon con 10<sup>6.28</sup> TCID<sub>50</sub> de BoHV-1.1 (cepa LA) inactivado con luz ultravioleta (10 minutos de exposición a lámpara Philips G15T8 a una distancia de 8 cm.), tres con sobrenadante de cultivo de células libre de BoHV y tres con 0.5µl de Concanavalina A/pozo (control de proliferación linfocitaria). Las placas fueron incubadas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> por 5 días y luego pulsadas con 1 µCi de (Methyl-3H) Thymidine/pozo por 18 horas y congeladas a -20 °C hasta su lectura en el contador de centelleo (Beta-Counter) del laboratorio de vacunas recombinantes del instituto de Higiene-Facultad de Medicina. Los resultados fueron emitidos en cuentas por minuto (CPM) y se calculó con estos el Índice de Estimulación (IE) y su desvío estándar (DS) (IE= media aritmética de las CPM en los pozos estimulados con BoHV-1.1 / media aritmética de las CPM en los pozos estimulados con sobrenadante de cultivo libre de BoHV).

#### **4.1 M & M para objetivo particular 2.2.1**

Infección experimental: Se realizó según protocolo descrito previamente por Guy & Potgieter (1985a). Seis terneros cruce Hereford, de 6 a 8 meses de edad y serológicamente negativos a BoHV-1 fueron mantenidos en aislamiento por 60 días y alimentados con concentrado de 18 % de proteína, y fardos de pradera. La estabulación fue realizada 10 días previos al comienzo del experimento.

Se infectaron dos terneros con la cepa LA (identificados como 215 y 216) que fueron utilizados como control positivo y dos con la cepa Uy-1999 (identificados como 213 y 226). Como las infecciones se realizaron en distintos momentos se utilizó un ternero control negativo para la infección con la cepa LA (217) y otro para la infección con la cepa Uy-1999 (221).

La infección se realizó por vía nasal y ocular utilizando como inóculo total 5 ml de MEM conteniendo 10<sup>7.926</sup> DICC<sub>50</sub> de virus. Los controles negativos fueron inoculados de la misma manera con sobrenadante de cultivo de células libre de BoHV-1.

Serología: se tomaron muestras de sangre por punción de la vena yugular en los días 0, 7, 10, 15, 20, 30, 45 y 69. Los sueros obtenidos fueron procesadas por SN *in Vitro* y enfrentados a las cepas LA y Uy-1999. La Media Geométrica (MG) de los títulos SN y el desvío estándar de la misma fue calculada en los terneros infectados.

Test de LP: se extrajo sangre con anticoagulante de los terneros infectados con la cepa LA los días 0, 8, 10, 15, 20, 30 y 45.

Aislamiento viral: se tomaron muestras de hisopados nasal y ocular los días 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 45 y 69 post-inoculación. Los resultados de la excreción viral fueron expresados como presencia o ausencia de ECP característico de BoHV.

Cuando se detectó la presencia del virus, su identificación fue realizada por IFD como se describió anteriormente.

#### **4.2 M & M para objetivo particular 2.2.2.**

Inmunodepresión: Se utilizó un protocolo de inmunodepresión farmacológica descrito por Whentink et al. (1990). Se administró Dexametazona sódica en dosis de 0.11 mg/kg (Caliercortin-Laboratorio Calier) y Prednisolona al toro Limousin por vía intramuscular en dosis de 0.3 mg/kg (Abicorten-Laboratorio Calier) durante 6 días consecutivos.

Las muestras de sangre para serología y LP fueron tomadas los días 0, 5, 7, 12, 16 y 22. Para aislamiento viral se tomaron hisopados nasal, ocular, prepucial y líquido seminal los días 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Basados en los resultados de Darcel & Dorward. (1975) para la detección de BoHV-1 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se seleccionaron las muestras en donde se entendía era más probable identificar ADN de BoHV-1. El sobrenadante de los hisopos ocular (días 0, 4, 5, 6, 7, y 9), prepucial (días 0, 6 y 8) y líquido seminal (días 0, 4, 5, 7, y 9) fueron enviados al Laboratorio de Virología-Facultad de Veterinaria en donde se realizó una Nested PCR descrita por Rocha et al. (1998) y cuyos cebadores internos amplifican un segmento de 344 pares de bases (pb).

Seguimiento serológico: El toro Limousin fue mantenido desde el año 2000 al 2004 en pasturas naturales y en contacto con otros bovinos. Las muestras de sangre para detectar anticuerpos específicos anti-BoHV fueron tomadas en intervalos nunca mayores a 6 meses durante el periodo 1999-2004. Todas las muestras de suero fueron procesadas por SN *in vitro* y fueron enfrentadas a las cepas LA y Uy-1999. Basados en los resultados de Kramps et al (1993) y para tratar de asegurar la ausencia de anticuerpos totales anti-BoHV-1 en las muestras tomadas en el periodo 1999 al 2004, se utilizaron dos *kits* comerciales de ELISA (Svanovir-Svanova Biotech; Civtest-Laboratorio Hipra) según las instrucciones del fabricante.

Evaluación de la respuesta inmune celular: Como controles positivos para la LP fueron utilizadas las muestras obtenidas de los terneros infectados con la cepa LA en la infección experimental descrita anteriormente. Como controles negativos y para establecer el punto de corte fueron utilizados 8 terneros seronegativos a BoHV-1. El punto de corte para clasificar una muestra como positiva fue calculado teniendo en cuenta la media aritmética (MA) más dos desvíos estándar (2DS) de los Índices de estimulación (IE) obtenidos en las muestras de los terneros seronegativos a BoHV-1.

#### **4.3 M & M para objetivo particular 2.2.3.**

Luego de la detección de anticuerpos específicos anti-BoHV-1, en el toro Limousin del cuál se aisló originalmente la cepa Uy-1999, se realizó una segunda inmunodepresión para evaluar la tercera hipótesis planteada (los anticuerpos anti-BoHV detectados en el año 2004 fueron inducidos por la reactivación de la cepa Uy-1999 o por una superinfección con otra cepa de campo).

Se utilizó el protocolo de inmunodepresión antes descrito y se consideró como día 0 aquel en el que se comenzó la administración de los corticoides. Se tomaron muestras de hisopados nasal, ocular, prepucial y líquido seminal para

aislamiento viral los días 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 del experimento. Las muestras de sangre para evaluar el título de anticuerpos SN se tomaron los días 0, 5, 10, 14 y 45.

**4.4 M & M para objetivos particulares 2.3.1 y 2.3.2** (Generar información sobre la dinámica de la transmisión de BoHV-1.1 y el impacto que tiene esta enfermedad sobre la tasa de preñez en condiciones de campo).

Animales de experimentación: Se utilizaron 83 vacas y tres toros que tuvieron un aislamiento mínimo previo al comienzo del experimento de 3 meses y resultaron negativos a la detección de anticuerpos anti-BoHV-1 por SN *in vitro* durante al menos tres sangrados con intervalos no menores a 21 días.

Vacas (n=83): craza Hereford (biotipo carnívor) de más de 4 años, con antecedente de parto previo y que se encontraban vacías y ciclando (presencia de cuerpo lúteo y folículos). Comenzaron el periodo de servicio con un promedio de peso de  $437 \pm 54$  Kg y un estado corporal no menor a 6 (escala de 1 a 9) (Sanpedro et al. 2003).

Toros (n=3): raza Hereford, de 3 años de edad, provenían del mismo establecimiento y nunca habían sido utilizados para la reproducción. Al examen andrológico eran aptos para el servicio y tenían características similares de circunferencia escrotal y calidad seminal. Previo al servicio se realizaron tres raspajes consecutivos para la detección de *Campylobacter Fetus* y *Trichomona Foetus* (laboratorio "Miguel C. Rubino") con resultado negativo.

Infección experimental de los toros: dos toros seleccionados al azar fueron infectados por vía ocular y nasal con 5 mililitros de una suspensión viral que contenía  $10^{7.5}$  DICC<sub>50</sub> de BoHV-1.1 (cepa LA), según el protocolo descrito previamente por Guy & Potgieter. (1985a). Uno de ellos fue infectado 60 días antes del comienzo del ensayo, por lo tanto, comenzó el servicio siendo seropositivo y latentemente infectado con BoHV-1.1. El segundo toro fue infectado al momento de entrar al rodeo (infección aguda) y el tercero, fue inoculado de la misma manera con sobrenadante de cultivo de células MDBK sin infectar (control negativo). El ensayo comenzó con la entrada de los toros al rodeo (día 0) y permanecieron realizando el servicio por monta natural durante 50 días.

Grupos experimentales: Las vacas fueron separadas al azar en 3 grupos y a cada grupo se le asignó uno de los toros:

- 1) grupo control negativo (GC)= 28 vacas + toro seronegativo.
- 2) grupo seropositivo (GS)= 28 vacas + toro seropositivo latentemente infectado al ingresar al servicio.
- 3) grupo infección aguda (GIA)= 27 vacas + toro infectado con BoHV-1.1 al comienzo del servicio.

Cada grupo fue mantenido en un potrero aislado de 33 hectáreas de campo natural (separación mínima entre grupos con cerco eléctrico perimetral y alambrados de ley de 8 metros) con fuentes de agua no compartidas y suplementado con sales minerales en polvo *ad-libitum* (Cobalfosal-DeAmbrosi S.A.).

Se compartieron las instalaciones para la toma de muestras con los bovinos y por lo tanto se tomaron medidas para la desinfección de las mismas (Cloruro de

Benzalconio a la dilución recomendada por el fabricante) y prevenir la contaminación cruzada entre los grupos del ensayo.

El GC y el GS comenzaron el ensayo al mismo tiempo y en el manejo dentro de las instalaciones, se trabajaba primero con el GC y luego con el GS. Las vacas de estos grupos fueron mantenidas hasta el día 180 del ensayo.

Con la finalidad de disminuir el riesgo de transmisión cruzada del BoHV-1.1 entre los grupos del ensayo, el GIA comenzó el servicio 30 días después que el GC y el GS. Las vacas del GIA se mantuvieron hasta el día 338 del experimento para poder observar pérdidas por abortos durante el periodo de gestación.

Evolución del peso: Para evaluar la posible influencia de la nutrición en los resultados reproductivos, el peso corporal de las vacas fue controlado los días -30, 0, 30 y 60 del experimento. La ganancia promedio durante el servicio fue calculada tomando como valor inicial el peso de cada vaca 30 días previo al servicio (-30).

Sincronización y servicio: Para concentrar los servicios y poder realizar el monitoreo de la evolución de la gestación en los tres grupos, previo al comienzo del ensayo todas las vacas fueron sincronizadas utilizando doble dosis (separadas 12 días) de un análogo sintético de la Prostaglandina F<sub>2α</sub> (d-cloprostenol: Sincron D-L Laboratorio Uruguay), en la dosis y vía recomendada por el fabricante. La entrada de los toros (día 0) coincidió con la administración de la segunda dosis del análogo sintético de la Prostaglandina F<sub>2α</sub>.

Para comparar la actividad cíclica de las vacas en los distintos grupos y valorar la influencia de este factor en la TP, la respuesta a la sincronización fue evaluada mediante observación a campo (2 veces/día) y utilizando el sistema de detección de celo mediante pintura en base de cola. Se consideraban en celo aquellas vacas en las que se observaron signos de estro y/o la pintura de la base de la cola estaba completamente borrada. El porcentaje de vacas que se encontraron en celo en cada uno de los grupos del ensayo fue calculado ( $n^{\circ}$  de vacas en celo/ $n^{\circ}$  total \*100).

Actividad de los toros: Para comparar la actividad de monta de los toros en los distintos grupos, se utilizó la observación a campo (2 veces/día) y un dispositivo (Chin-ball) que marcaba las vacas que eran servidas. Este dispositivo fue colocado al comienzo del servicio. Se consideraban como servidas aquellas vacas en las que se observó la monta a campo y/o tenían pintura del Chin-ball en el lomo y flancos. El porcentaje de vacas que fueron montadas en cada uno de los grupos del ensayo fue calculado ( $n^{\circ}$  de vacas servidas/ $n^{\circ}$  de vacas ofrecidas \*100).

Detección de gestación: Para valorar la evolución de la TP ( $n^{\circ}$  de vacas gestadas/ $n^{\circ}$  total \*100) durante el servicio, se realizaron (con el apoyo del Área de Reproducción Facultad de Veterinaria) tres ecografías los días 35, 52 y 71 del ensayo. Las fechas en el protocolo de ensayo fueron fijadas tomando en cuenta que al menos hubieran pasado 30 días, de la actividad cíclica observada en las vacas luego de la sincronización. A partir del cuarto mes el seguimiento de la gestación fue realizado por palpación rectal los días 120, 180 (GC, GS y GIA), en el GIA también se realizó los días 224 y 262.

Muestras para serología: En el toro infectado 60 días antes del comienzo del servicio se tomaron muestras los días 0, 7, 10, 21 y 30 pi.

La detección de anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 en las vacas fue utilizada como indicador de infección durante el servicio. En las vacas del GC y GS se tomaron muestras por punción de la vena coccígea los días 0, 14, 30, 49, 61, 90, 120, 150 y 180, en el GIA los días 0, 14, 21, 30, 38, 52, 71, 87, 120, 147, 224, 262 y 338 y en los toros los días 0, 7, 9, 19, 26, 30 y 49 del experimento. Para la SN *in Vitro* se utilizó la cepa de referencia LA y se calculó la media geométrica (MG) de los títulos SN y el desvío estándar en los grupos donde se detectó seroconversión a BoHV-1. La prevalencia serológica de cada grupo fue calculada en cada punto de muestreo ( $n^{\circ}$  de vacas seropositivas/ $n^{\circ}$  total \* 100).

Las muestras de todas las vacas del experimento al día 0 y aquellas vacas que habiéndose detectado como seropositivas, se hicieron seronegativas a BoHV-1 por SN *in vitro* en algún momento del ensayo, fueron evaluadas también utilizando un *kit* comercial de ELISA según las instrucciones del fabricante (Civtest-Laboratorio Hipra).

Muestras para aislamiento viral: En el toro infectado 60 días antes del comienzo del servicio se tomaron muestras de hisopados nasal y ocular los días 0, 7, 14, 21, 30 y 53 pi.

Durante el servicio, la excreción de BoHV-1.1 fue evaluada en los toros por aislamiento viral en muestras de hisopados ocular, nasal, prepucial y líquido seminal los días 0, 2, 4, 7, 14, 21, 25, 30, 38 y 49. Las muestras de hisopos se transportaron en 2 ml de (MEM) y se centrifugaron a 500 g por 10 minutos. El sobrenadante de estas muestras y el líquido seminal se conservaron en freezer de - 80 °C hasta su procesamiento.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el Software Intercooled STATA 8.0 (Stata Corp. 2007).

Los cuadros de frecuencias de la actividad de monta de los toros, actividad cíclica de las vacas y de la TP observada en cada uno de los grupos fueron sometidas al Test exacto de Fisher estableciendo un nivel de significación de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS (PRIMERA PARTE).

**Infección experimental:** Los terneros infectados con la cepa Uy-1999 mostraron signos y síntomas típicos de la infección con BoHV-1.1, similares a los controles positivos (cepa LA). Se observó hipertermia, aumento de la frecuencia respiratoria, rinitis, conjuntivitis, corrimiento nasal y ocular, ruidos respiratorios aumentados, tos y depresión.

El BoHV-1 fue aislado e identificado por IFD a partir de hisopados oculares y nasales en todos los terneros infectados. El virus fue aislado durante un periodo de tiempo mayor (día 35) en uno de los terneros infectados con la cepa Uy-1999. La dinámica de la excreción pi con las cepas LA y Uy-1999 se muestra en el cuadro I.

La cepa Uy-1999 fue inmunogénica, ya que se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 por SN *in Vitro* en los terneros infectados. Los títulos SN encontrados cuando las muestras de suero fueron evaluadas utilizando la cepa de referencia LA o el aislamiento autóctono Uy-1999 fueron idénticos.

En ambos grupos (control positivo y cepa Uy-1999) los títulos SN más altos fueron detectados al día 20 postinfección como se observa en el gráfico 1. Sin embargo, los títulos SN detectados en los controles positivos (cepa LA) fueron más altos (MG= 320) a los encontrados en los terneros infectados con Uy-1999 (MG= 91). Los controles negativos no presentaron síntomas de infección, no se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 y las muestras para aislamiento viral resultaron negativas.

Cuadro I. Seguimiento de la excreción de BoHV-1.1 en terneros infectados con las cepa de referencia LA y Uy-1999 (aislamiento en cultivos celulares).

Días	Cepa LA (control positivo)				Cepa Uy-1999			
	215		216		213		226	
	HO	HN	HO	HN	HO	HN	HO	HN
0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	-	-	-	+	+	+	+
21	-	-	-	-	-	+	-	-
28	-	-	-	-	+	-	-	-
35	-	-	-	-	-	+	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-

HO= Hisopado ocular; HN= Hisopado nasal; += presencia de ECP característico de BoHV;  
- = ausencia de ECP.

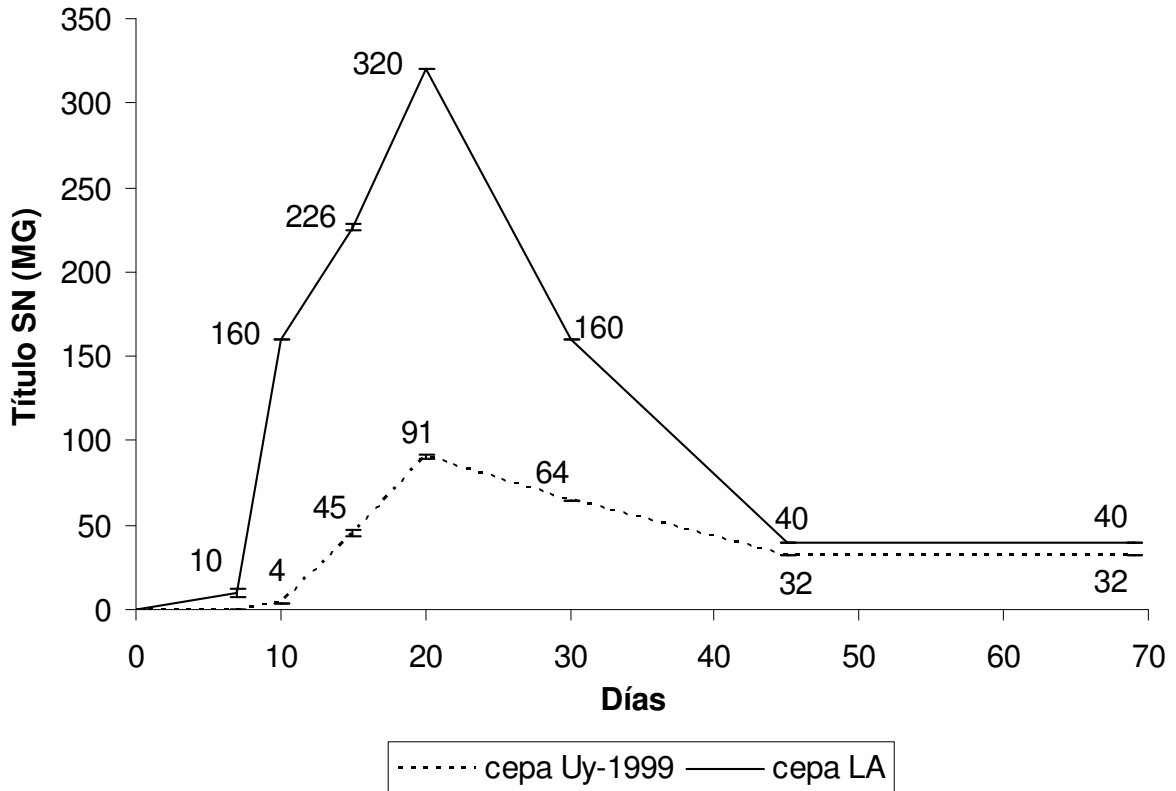


Gráfico 1. Media geométrica (MG) del título de anticuerpos neutralizantes  $\pm$  DS en bovinos infectados experimentalmente con las cepas de referencia LA y Uy-1999.

Los resultados de la evaluación de la respuesta inmune celular por medio del test de Linfoproliferación *in vitro* (LP) en los terneros utilizados como controles negativos y positivos se muestran en los cuadros II y III respectivamente. El Índice de estimulación (IE) promedio en los terneros ( $n= 8$ ) seronegativos a BoHV-1 utilizados para fijar el punto de corte fue  $1.66 \pm 0.9$ . En base a este resultado el punto de corte para dar una muestra como positiva se fijó en un IE= 3.46 (promedio del IE + 2DS). Se detectó respuesta inmune celular específica solamente en el ternero identificado como 216 e inoculado con la cepa LA al día 15 pi (IE= 8.9).

Cuadro II. Resultados del *test* de Linfoproliferación *in vitro* en terneros seronegativos a BoHV-1 utilizados para fijar el punto de corte.

Identificación controles negativos ( $n= 8$ )	1	2	3	4	5	6	7	8	MA
IE	1.06	3.4	0.5	1.5	2.1	2.24	1.21	1.25	<b>1.66</b>
$\pm$ DS	0.85	1.8	0.2	0.59	0.59	1.26	0.44	0.61	<b>0.9</b>

IE= Índice de estimulación, MA= Media Aritmética, DS= Desvío estándar (muestras en triplicado).



Cuadro III. Resultados del *test* de Linfoproliferación *in vitro* en terneros infectados con la cepa LA (215 y 216) y control.

Días postinfección	0	8	10	15	20	30	45
IE Control $\pm$ DS	1.3 $\pm$ 0,4	ne	0.7 $\pm$ 0,2	2.3 $\pm$ 0,6	2.2 $\pm$ 1,3	1 $\pm$ 0,3	ne
IE (215) $\pm$ DS	1 $\pm$ 0,3	1.9 $\pm$ 0,1	2 $\pm$ 0,6	0.8 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,4	1.1 $\pm$ 0,7	1.6 $\pm$ 0,6
IE (216) $\pm$ DS	1.3 $\pm$ 0,5	ne	1.1 $\pm$ 0,8	8.9 $\pm$ 3,9	1.2 $\pm$ 0,8	0.6 $\pm$ 0,2	0.9 $\pm$ 1

IE= Índice de estimulación  $\pm$  DS (muestras en triplicado); ne= no evaluada.

**Primera Inmunodepresión del toro Limousin:** Luego de la primera inmunodepresión no se logró re-aislar la cepa Uy-1999. Sin embargo, se detectó ADN de BoHV-1 por la técnica de PCR en el líquido seminal del día 4 y en el hisopado prepucial del día 6 (figura 1). La banda que aparece en la muestra de hisopado prepucial del día 6 post-inmunodepresión (línea 8) es evidente y corresponde a un segmento de ADN entre 300 y 400 pb, que coincide con el control positivo de BoHV-1 (línea 1). En la muestra de líquido seminal del día 4 (línea 5), se observa con menos nitidez una banda similar a la anterior. No se detectó ADN de BoHV-1 en el resto de las muestras procesadas por PCR.

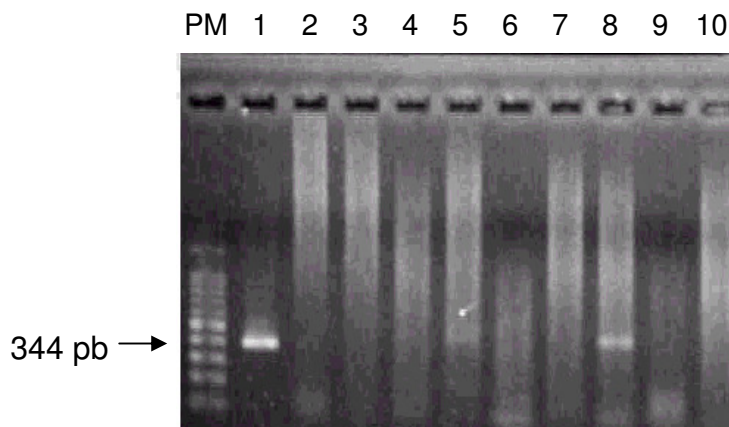


Figura 1. Identificación de ADN de BoHV-1 mediante PCR en muestras de la primera inmunodepresión del toro Limousin. PM= Marcador de Peso Molecular de ADN (100 pb), 1) BoHV-1 (control positivo), 2) Hisopo Ocular día 0, 3) Líquido Seminal día 0, 4) Hisopo Ocular día 4, 5) Líquido Seminal día 4, 6) H<sub>2</sub>O, 7) Hisopo Ocular día 6, 8) Hisopo Prepucial día 6, 9) Hisopo Ocular día 9, 10) Líquido Seminal día 9.

No se detectaron anticuerpos anti-BoHV en las muestras para serología obtenidas en el periodo 1999 al 2004 y tampoco post-primera inmunodepresión.

Como se muestra en el cuadro IV no se detectó respuesta celular a BoHV-1.1 en las muestras estudiadas post-inmunodepresión con corticoides.

Cuadro IV. Resultados del *test* de Linfoproliferación *in vitro* en el toro Limousin luego de la primer inmunodepresión con corticoides.

Días postinmunodepresión	0	5	7	12	16	22
IE ± DS	1.6 ± 0,5	1.6 ± 0,3	2.8 ± 1,1	1.5 ± 0,6	0.6 ± 0,4	0.6 ± 0,8

IE= Índice de estimulación ± DS (muestras en triplicado)

**Segunda Inmunodepresión del toro Limousin:** En mayo del año 2004 se detectaron anticuerpos específicos anti-BoHV-1 por S.N *in vitro* y ELISA en el toro Limousin luego de 5 años de permanecer seronegativo (Título SN= 16).

Se aisló BoHV-1 de las muestras de hisopado prepucial y líquido seminal los días 7 a 10 post segunda inmunodepresión. La cepa aislada fue denominada Uy-2004 e identificada como BoHV-1 por IFD y caracterizada posteriormente mediante anticuerpos monoclonales, PCR y corte con enzimas de restricción como BoHV-1.2a por Puentes et al. (2007).

La evolución del título de anticuerpos neutralizantes (Título SN) postinmunodepresión se muestra en el gráfico 2.

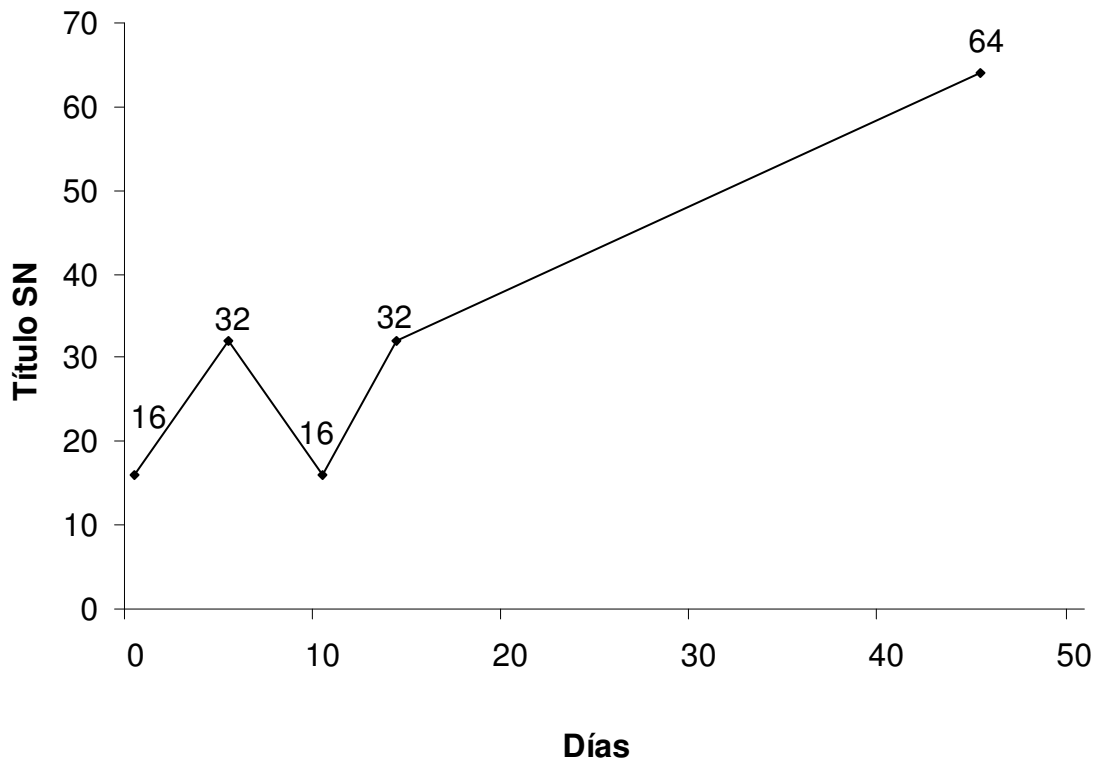


Gráfico 2. Evolución del título de anticuerpos neutralizantes en el toro Limousin luego de la segunda inmunodepresión (año 2004).

## **5.2 RESULTADOS (SEGUNDA PARTE).**

El toro infectado 60 días antes del comienzo del servicio mostró síntomas leves pi (depresión y corrimiento ocular seroso por 2 días). El BoHV-1 fue aislado del día 7 al 21 pi a partir de muestras de hisopados ocular y nasal. Se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-BoHV a partir del día 10 pi (Título SN= 32). Los títulos SN los días 21 y 30 pi fueron 64 y 32 respectivamente. Estos resultados demuestran que la infección experimental realizada con la cepa LA previo al comienzo del servicio (día 0) fue efectiva, y por lo tanto, asumimos que se estableció latencia. Este reproductor (toro seropositivo y latentemente infectado) realizó el servicio por monta natural en las vacas del GS.

Todas las vacas utilizadas en el experimento aumentaron de peso desde el inicio y durante todo el servicio y la ganancia promedio observada fue de  $354 \pm 153$  g/día. En el gráfico 3 se muestra la evolución de la ganancia de peso por grupo durante los primeros 60 días del ensayo (la primer pesada se realizó 30 días antes del comienzo del servicio).

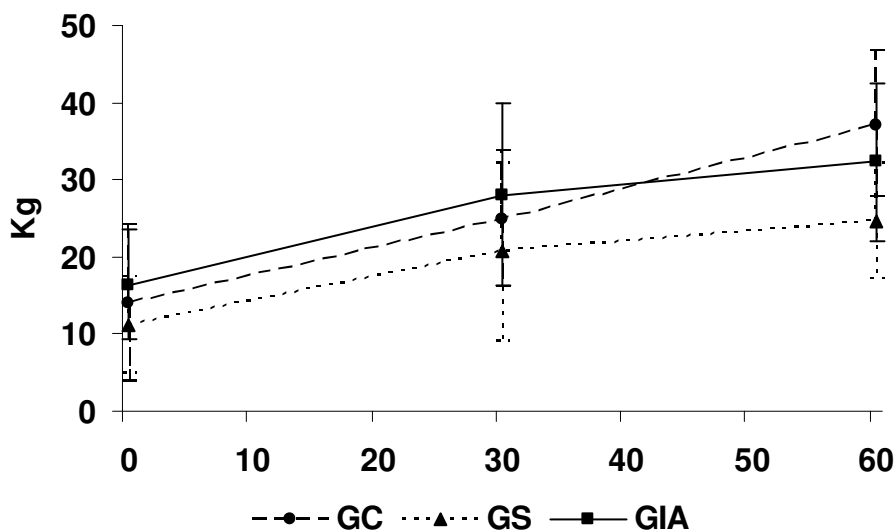


Gráfico 3. Evolución de la ganancia de peso (Kg)  $\pm$  el desvío estándar en las vacas de los GC, GS y GIA durante los primeros 60 días del ensayo.

Se detectó la presencia de estro en el 100, 89 y 96 % de las vacas del GC (control), GS (seropositivo) y GIA (infección aguda) respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ( $p= 0.121$ ).

Se detectaron como servidas (marcadas con pintura del Chin-Ball) el 89, 70 y 71 % de las vacas en los GC, GS y GIA respectivamente, no encontrándose diferencias significativas en la actividad de monta de los toros durante el servicio ( $p= 0.171$ ).

Al inicio del experimento (día 0) todas las muestras para serología de las vacas ( $n= 83$ ) y de los toros del GC y el GIA resultaron negativas para la detección de anticuerpos anti-BoHV-1 por las técnicas de SN *in Vitro* y ELISA.

No se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 en ninguno de los bovinos del GC y en las vacas del GS durante todo el ensayo.

La seroconversión específica (medida indirecta de infección con BoHV-1) fue comprobada únicamente en el GIA en el 70 % (19/27) de las vacas a los 30 días del comienzo del servicio. El restante 30 % (8/27) permaneció seronegativa hasta el final del ensayo.

La prevalencia serológica en las vacas del GIA durante el ensayo disminuyó de un 70 % (19/27) al día 30, a un 33 % (9/27) al día 147 del ensayo. El descenso observado en los primeros 7 meses fue debido a que el 53 % (10/19) de las vacas que fueron detectadas como infectadas (seropositivas) al día 30, se hicieron gradualmente seronegativas desde el día 52 al 224. De estas 10 vacas el 60 % (6/10) permanecieron como negativas hasta el final del ensayo y el 40 % 4/10 volvieron a hacerse positivas en algún momento del mismo. A partir del día 262 se observó un aumento en la prevalencia serológica, debido a que algunas de las vacas infectadas (seropositivas) que se hicieron seronegativas, volvieron a ser detectadas como positivas.

Las muestras de las vacas que se hicieron seronegativas a BoHV-1 por SN *in vitro* durante el ensayo dieron resultado negativo también por el test de ELISA. La dinámica de la prevalencia serológica en las vacas del GIA durante los 338 días se muestra en el gráfico 4.

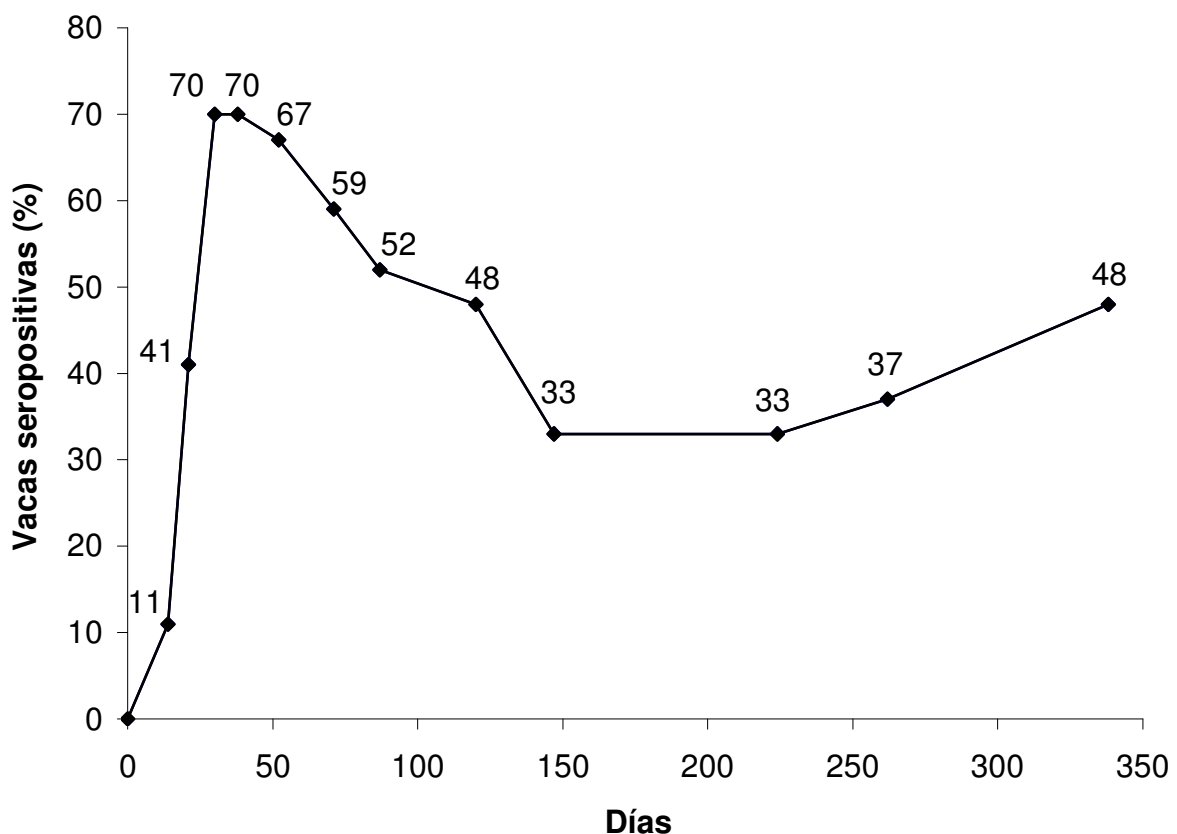


Gráfico 4. Dinámica de la respuesta a la infección con BoHV-1.1 (seropositivas) en vacas del grupo infectado agudo (GIA).

El rango en el que oscilaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en las vacas que se infectaron (seropositivas) en el GIA fue de 2 a 64. El 53 % (10/19) de

las mismas se hicieron seronegativas en algún momento del ensayo. El 40 % (4/10) se hicieron seronegativas en promedio a los 52 días de haber sido detectadas como infectadas y presentaron un título SN máximo= 2. El 60 % (6/10) se hicieron seronegativas en promedio a los 108 días y presentaron un título SN máximo= 4.

Todas las vacas infectadas que permanecieron seropositivas durante el ensayo (9/19= 47 %) presentaron títulos SN iguales o mayores a 8.

Durante el seguimiento serológico de las vacas del GIA, se detectó un aumento de cuatro diluciones en el título SN (4 a 64) en una vaca al día 87 y en otra al día 147 del ensayo.

En el gráfico 5 se observa la dinámica del título SN en las vacas del GIA encontrándose el valor máximo al día 21 (MG= 7.1) y luego una meseta hasta el final del ensayo.

El toro infectado al comienzo del servicio (infección aguda) y que trabajó con las vacas del GIA presentó síntomas leves pi (corrimiento ocular y nasal seroso por 3 días) y se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 al día 9 con un pico al día 20 pi, como se observa en el gráfico 6. En este gráfico se presenta también la evolución del título SN en el toro seropositivo, latentemente infectado que trabajó en el grupo GS.

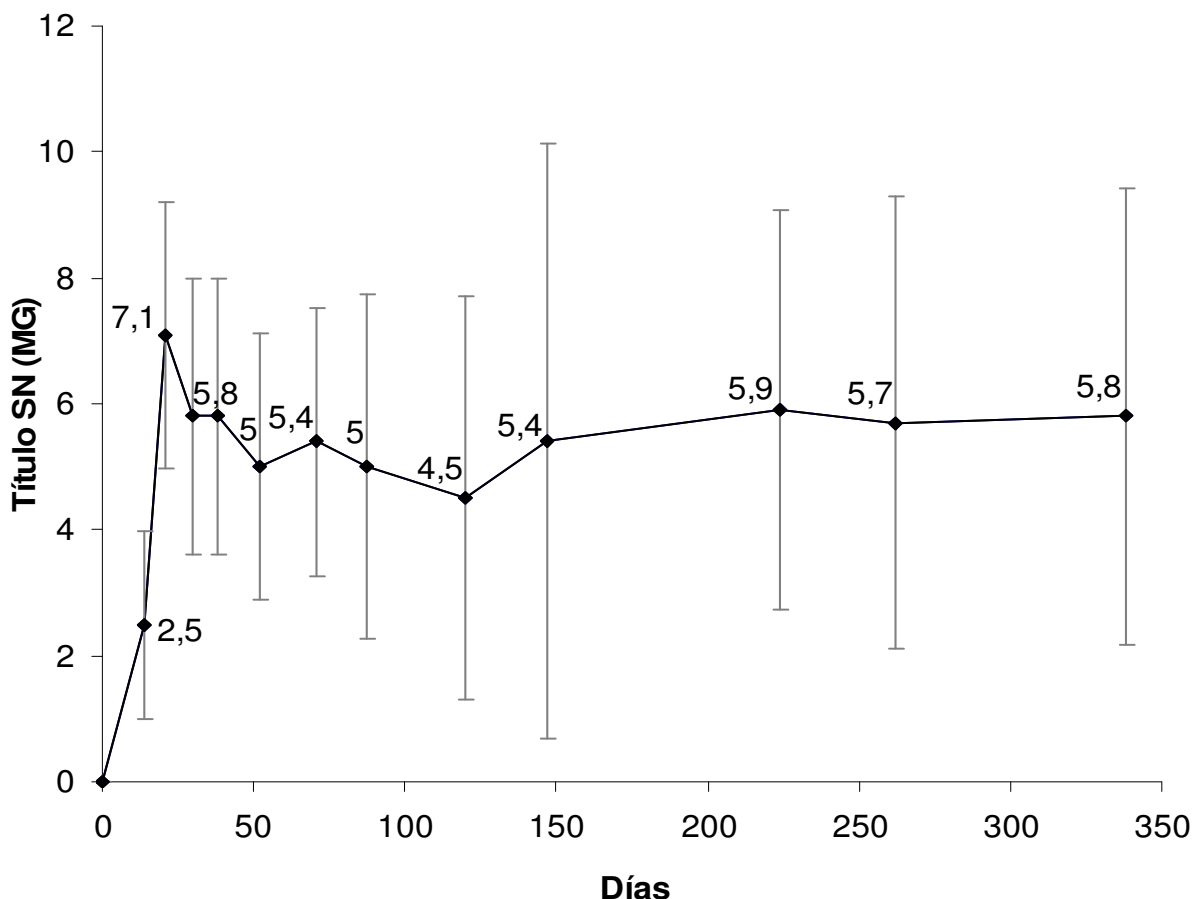


Gráfico 5. Título de anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 (MG) en vacas del grupo infectado agudo (GIA) ± el desvío estándar.

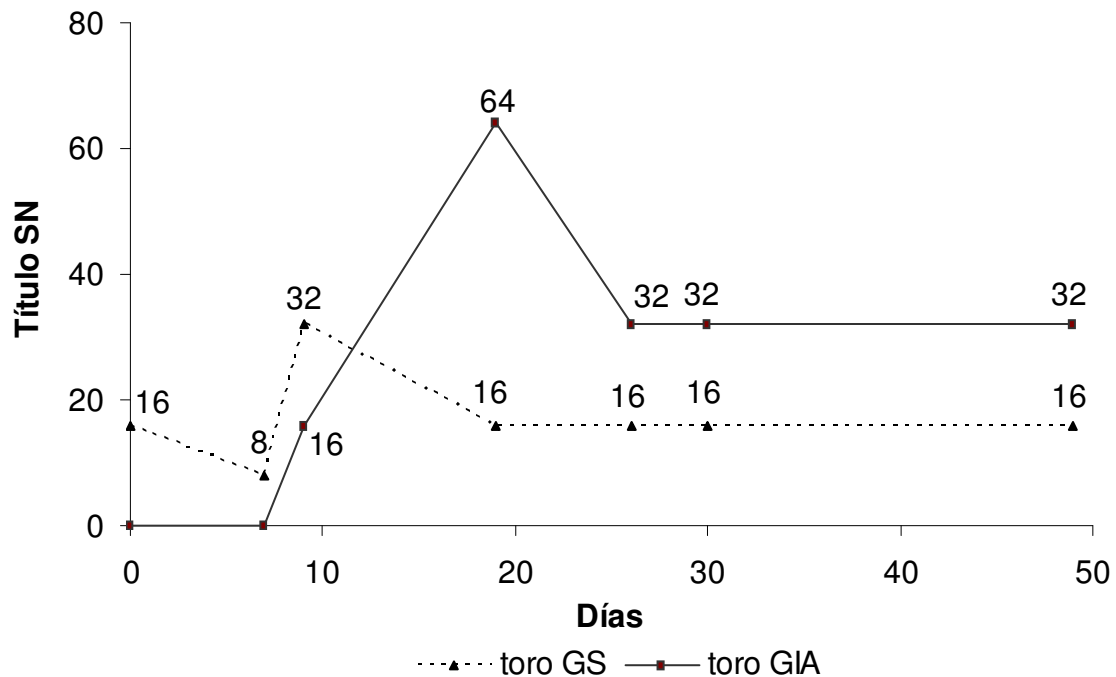


Gráfico 6. Evolución del título de anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 en el toro del grupo seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA) durante el periodo de servicio.

Todas las muestras de hisopos y líquido seminal de los toros del GC y GS durante el servicio resultaron negativas para aislamiento viral.

El BoHV-1 fue aislado e identificado por IFD únicamente en las muestras del toro con infección aguda al comenzar el servicio. Los resultados del aislamiento viral se muestran en el cuadro V.

Cuadro V. Aislamiento de BoHV-1 en cultivos celulares de muestras del toro con infección aguda al comenzar el servicio.

Muestras	Días									
	0	2	4	7	14	21	25	30	38	49
HO	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
HN	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
HP	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
LS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

HO= Hisopado ocular; HN= Hisopado nasal; HP= Hisopado prepucial; LS= Líquido seminal += presencia de ECP característico de BoHV-1; -= ausencia de ECP.

La evolución de la tasa de preñez (TP) durante el servicio, fue evaluada en todas las vacas del experimento. En la primera ecografía (día 35) la TP del GS (50 %) y el GIA (26 %) fue un 4 y 28 % inferior a la encontrada en el GC (54 %) respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la TP entre los grupos ( $p=0.092$ ).

Cuando se comparó la TP en la segunda ecografía (día 52), se encontraron diferencias significativas ( $p= 0.0001$ ). Para evaluar cuál era el grupo que difería se utilizó la corrección de Bonferroni ( $\alpha^*=0.01666667$ ). Las diferencias encontradas en la TP fueron entre el GIA (33 %) y el GC (86 %)  $p= 0.0001$ . No existieron diferencias significativas entre la TP del GS (79 %) y el GC (86 %)  $p= 0.729$  ( $\alpha^*= 0.01666667$ ).

Una única reabsorción embrionaria fue constatada por ecografía en una vaca infectada con BoHV-1 (seropositiva) del GIA al día 52 del ensayo.

En la tercera ecografía (día 71) aumentó el número de vacas gestadas en el GIA (78 %) y en el GS (93 %) no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ( $p= 0.313$ ).

Luego de la tercera ecografía no se observaron cambios en la TP en el GC y el GIA. En el GS la disminución en la TP observada, fue ocasionada por la muerte de una vaca que se encontraba gestada, por causas ajenas a la enfermedad en estudio al día 130 del experimento.

Las vacas del GC y del GS se mantuvieron hasta los 180 días del experimento no observándose abortos. Las del GIA mantuvieron la gestación y tuvieron partos normales con terneros viables.

El gráfico 7 muestra los resultados obtenidos en el seguimiento de la gestación realizados en todos los grupos del experimento.

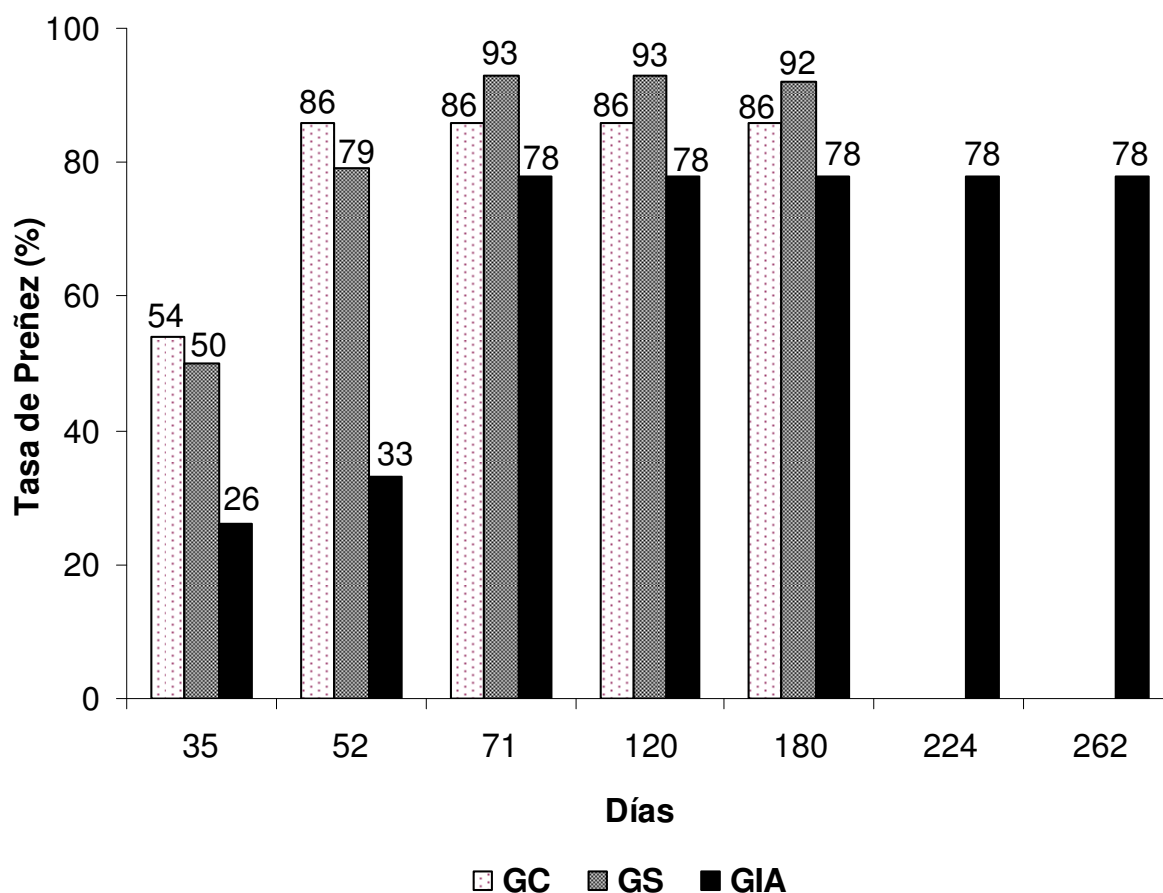


Grafico 7. Evolución de la Tasa de Preñez (%) en el grupo control (GC), seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA).

Dentro del GIA y con respecto a la infección con BoHV-1 durante el periodo de servicio, pueden definirse dos subgrupos de vacas. Uno de ellos lo constituyen aquellas en las que no se detectó respuesta humoral anti-BoHV-1 (seronegativas) y que se consideraron como no infectadas (n= 8). Otro subgrupo son aquellas en las cuales se detectó respuesta humoral anti-BoHV-1 (seropositivas) y que se consideró que fueron infectadas y permanecieron latentemente infectadas con BoHV-1.1 (n= 19). En el cuadro VI puede observarse la evolución de la TP durante el servicio en los dos subgrupos definidos anteriormente. En el GIA el 84, 79 y 26 % de las vacas infectadas con BoHV-1 (seropositivas) se encontraban vacías al momento de la primera, segunda y tercera ecografía respectivamente.

Cuando se evaluaron las tablas de frecuencia que se muestran en el cuadro VI al momento de la primera ( $p= 0.145$ ), segunda ( $p= 0.072$ ) y tercera ecografía ( $p= 0.633$ ) no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos de vacas descritos para el GIA.

El 44 % (12/27) de las vacas del GIA lograron concebir al final del servicio ya que fueron detectadas como gestadas recién al momento de la tercera ecografía. El 83 % (10/12) de las mismas se encontraba infectada con BoHV-1 (seropositivas). Por lo tanto, la recuperación en la TP observada en el GIA, fue debida fundamentalmente, a que las vacas infectadas con BoHV-1 lograron concebir hacia el final del periodo de servicio como se muestra en el cuadro VI.

Cuadro VI. Evolución de la Tasa de Preñez (TP) en las vacas del grupo infectado agudo (GIA) en relación al estatus con respecto a la infección con BoHV-1.1.

	<b>Primera Ecografía (día 35)</b>		<b>Segunda Ecografía (día 52)</b>		<b>Tercera Ecografía (día 71)</b>	
	Seropositivas (Infectadas)	Negativas	Seropositivas (Infectadas)	Negativas	Seropositivas (Infectadas)	Negativas
<b>Gestadas</b>	3	4	4	5	14	7
<b>Vacías</b>	16	4	15	3	5	1
<b>TP (%)</b>	16	50	21	63	74	88



## 6. DISCUSIÓN

Durante la infección experimental el cuadro clínico desarrollado por los terneros infectados con la cepa Uy-1999 fue similar al observado en los controles positivos (infectados con la cepa de referencia LA). Los síntomas coinciden con los reportados previamente (Madin et al. 1956; Spilki et al. 2004). La cepa Uy-1999 fue inmunogénica ya que se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 en los dos terneros infectados. Al igual que en los controles positivos la respuesta humoral fue evidenciada a partir del día 10 y el título SN máximo fue observado al día 20 pi.

Los títulos SN inducidos por ambas cepas no difieren de los encontrados por otros autores (Kaashoek et al. 1996; Lemaire et al. 2000a). Sin embargo, cuando comparamos la respuesta humoral pi, se observa que los títulos de anticuerpos SN generados por los terneros infectados con la cepa LA fueron superiores a los infectados con la cepa Uy-1999. Estos resultados no coinciden con lo reportado anteriormente por Kaashoek et al. (1996), quienes utilizando un modelo de infección similar, no detectaron diferencias en la inmunogenicidad de 7 diferentes cepas de BoHV-1.1. Para poder explicar porque la cepa en estudio Uy-1999 indujo menor título de anticuerpos

Nuestros resultados muestran que la cepa Uy-1999 fue menos inmunogénica que la cepa LA. Sin embargo, comparar la respuesta inducida por la cepa autóctona con otras cepas de BoHV-1.1, no fue el objetivo en esta etapa de la tesis y se considera que deben realizarse estudios con un mayor número de animales. No obstante, podemos afirmar, que la falta de respuesta inmune específica en el toro Limousin, no fue debida a las características inmunogénicas de esta cepa autóctona, ya que la infección de los terneros ocasionó un cuadro clínico compatible con la enfermedad y se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 en niveles similares a los reportados por otros autores. Basados en estos resultados la primera hipótesis planteada en el presente trabajo (la cepa Uy-1999 no es inmunogénica) no fue aceptada.

La cepa Uy-1999 fue excretada por más tiempo en uno de los bovinos infectados experimentalmente ya que pudo ser aislada hasta el día 35 en las muestras de hisopado nasal. Si bien el tiempo de excreción viral puede variar entre diferentes cepas de BoHV-1, los menores niveles de anticuerpos observados en los terneros infectados con la cepa Uy-1999 podrían ayudar a explicar porque esta cepa fue excretada por más tiempo que la cepa LA. En este sentido, Babiuk et al. (1996) han propuesto que la respuesta celular es el mecanismo fundamental para controlar la replicación viral durante la primo-infección y que los anticuerpos tienen un rol secundario. La respuesta celular post-infección con la cepa Uy-1999 no fue evaluada en este trabajo, porque solo pudo detectarse proliferación específica en una de las 11 muestras procesadas durante la infección aguda en los controles positivos (terneros infectados con la cepa LA). Esto concuerda con lo ya comunicado por Wentink et al. (1990) y Rutten et al. (1990), quienes ya habían reportado una baja sensibilidad y una alta variabilidad de esta técnica para detectar bovinos infectados con BoHV-1.

Resulta interesante analizar porque durante 5 años luego del aislamiento de la cepa Uy-1999 no se detectaron anticuerpos específicos anti-BoHV-1 en el toro Limousin. Todas las muestras de suero obtenidas durante ese periodo fueron procesadas por SN *in Vitro* y dos test comerciales de ELISA, lo que fortalece los

resultados serológicos obtenidos. La posibilidad de que los anticuerpos inducidos pi tuvieran diferencias en la capacidad de neutralizar las cepas Uy-1999 y LA *in Vitro*, fue descartada, ya que los títulos SN obtenidos fueron iguales cuando los sueros se enfrentaron a la cepa Uy-1999 o LA. Por otro lado, las técnicas serológicas que fueron utilizadas para la detección de anticuerpos específicos anti-BoHV-1 son las más comúnmente empleadas en los laboratorios de diagnóstico (Pidone et al. 1999b) y son las mismas que en el año 2004 detectan anticuerpos anti-BoHV-1 en el mismo bovino. Por lo antedicho, descartamos la posibilidad de que la falta de detección de anticuerpos anti-BoHV-1 fuera ocasionada por una baja sensibilidad de las técnicas utilizadas en el presente trabajo. No obstante, diferencias en la sensibilidad y especificidad de los test serológicos se han comunicado por varios autores (Kramps et al. 1993; Deregt et al. 1993; Medici et al. 2000; Cortez et al. 2001).

La posibilidad de que los anticuerpos de origen calostrual hayan impedido el desarrollo de la respuesta inmune anti-BoHV pi es poco probable, ya que luego de la primer inmunodepresión el toro Limousin permaneció seronegativo a BoHV-1 y no se detecto respuesta celular específica por LP *in vitro*. La interferencia de los anticuerpos calostruales en la generación de una respuesta inmune activa pi con BoHV-1 o luego de la vacunación ha sido reportada por varios autores (Brar et al. 1978; Lemaire et al. 1995; Fulton et al. 2003). Lemaire et al. (2000a) demostraron la falta de respuesta humoral pi con BoHV-1.1, en terneros que tenían altos niveles de anticuerpos calostruales previo a la infección. Estos bovinos pi quedan latentemente infectados y seronegativos pero desarrollan repuesta inmune humoral y celular anti-BoHV-1 luego de la inmunodepresión con corticoides o infecciones secundarias. Si la ausencia de respuesta humoral en el toro Limousin fue originada por un evento similar al descrito por Lemaire et al. (2000a) la inmunodepresión con corticoides debería haber reactivado el virus latente y éste estimular el sistema inmune para generar una respuesta detectable. Sobre esto último, debemos considerar, que como ya se discutió anteriormente, los resultados obtenidos en la LP *in vitro* no permiten asegurar que no hubo respuesta celular luego de la inmunodepresión, pero sí hubo falta de anticuerpos detectables.

Por otro lado, esta descrito que los anticuerpos de origen calostrual se mantienen en niveles detectables como máximo hasta los 6 meses (Menanteau-Horta et al. 1985) y el bovino al momento del aislamiento tenía 9 meses de edad (Alonzo et al. 2002).

La hipótesis de que en septiembre de 1999 los síntomas clínicos observados fueran ocasionados por otra causa y que el aislamiento de la cepa Uy-1999 fuera la consecuencia de la reactivación y excreción del virus que se encontraba latente por una infección previa no puede ser descartada. Sin embargo, el aislamiento original en el año 1999 se realizó únicamente en muestras de hisopados nasal y ocular. Debido a esto, y al cuadro clínico que presentó el toro Limousin al momento del aislamiento (corrimientos nasal y ocular, conjuntivitis, síntomas nerviosos), podemos decir que la infección fue por vía aerógena. Por lo tanto, post-inmunodepresión el virus sería excretado por esta misma vía, como se ha descrito por varios autores (Rossi et al. 1982; Pastoret et al. 1982; Engels & Ackermann. 1996). Luego de la primer inmunodepresión, la cepa Uy-1999 no fue reaislada. Sin embargo, se identificó ADN de BoHV-1 a partir de líquido seminal e hisopado prepucial lo que confirmó que el toro Limousin se encontraba latentemente infectado y por lo tanto, la

segunda hipótesis planteada (luego del aislamiento de la cepa Uy-1999 el toro limousin permaneció latentemente infectado con BoHV-1) fue aceptada.

Luego de la primer inmunodepresión con corticoides el toro Limousin continuó serologicamente negativo a BoHV-1 y se comprobó que estaba latentemente infectado.

La razón por la cuál la cepa Uy-1999 nunca fue reaislada se podría deber a la falta de alguna de las glicoproteinas mayores de BoHV-1.1. Kaashoek et al. (1996) comunicaron que algunas cepas de BoHV-1.1 presentan dificultades para ser reactivadas y reaisladas luego de la inmunodepresión con corticoides, atribuyéndolo a diferencias genéticas entre las cepas utilizadas. Schynts et al. (2001) demostraron, que la infección con cepas mutantes que no poseen el gen que codifica la gE puede no inducir latencia. En este sentido, la cepa Uy-1999 demostró su capacidad para producir la enfermedad, fue excretada en los terneros infectados durante 14 a 35 días y los estudios de caracterización con enzimas de restricción (*Hind III*) y anticuerpos monoclonales anti-gE no mostraron diferencias con las cepas de referencia (Puentes et al. 2007). Por otro lado, la secuencia de la región carboxi terminal del gen que codifica la gC de Uy-1999 no mostró mutaciones cuando se comparó con la región homóloga de las cepas de referencia (Esteves et al. 2008). Los estudios realizados hasta el momento, no han detectado diferencias antigénicas o moleculares que puedan explicar porque Uy-1999 nunca fue reaislada.

Desde el año 2000 el toro Limousin permaneció en contacto con otros bovinos y las muestras tomadas para serología hasta abril de 2004 fueron negativas. En el mes de mayo, se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 y surge así la tercera hipótesis de la tesis (la detección de anticuerpos anti-BoHV-1, 5 años pi con la cepa Uy-1999 pudo ser ocasionada por la reactivación de la cepa Uy-1999 o por la re-infección con una cepa diferente de BoHV-1). Luego de la inmunodepresión con corticoides (año 2004), se realizó el aislamiento a partir de líquido seminal e hisopado prepucial de una cepa de BoHV-1 Uy-2004, caracterizada como perteneciente al subtipo 1.2a (Puentes et al. 2007) lo que confirmó que se trataba de una cepa diferente a Uy-1999. Basados en estos resultados, es altamente probable, que la detección de anticuerpos en el año 2004, haya sido estimulada por la cepa Uy-2004.

Las cepas autóctonas Uy-1999 (BoHV-1.1) y Uy-2004 (BoHV-1.2a) fueron aisladas del mismo bovino con 5 años de diferencia, lo que demuestra que fue infectado naturalmente con dos subtipos diferentes. La posibilidad de la superinfección con subtipos diferentes de BoHV-1 fue comprobada experimentalmente por Whestone & Miller (1989). Si bien, este ultimo trabajo citado, proporcionó evidencia experimental de que diferentes subtipos podían infectar al mismo tiempo un bovino, hasta el momento, no se encontraron trabajos que reporten la superinfección natural. Este fenómeno ha sido propuesto por Thiry et al. (2006) como un importante mecanismo evolutivo de los alfa herpesvirus, ya que puede propiciar la recombinación intraespecífica o interespecífica e inducir modificaciones que cambien la virulencia o generen nuevas cepas de BoHV (Henderson et al. 1990; Katz et al. 1990; Meurens et al. 2004b). Es por esta razón que poseer aislamientos autóctonos es fundamental para poder monitorear las cepas que se encuentran circulando en nuestro país. Esto ha permitido realizar análisis filogenéticos regionales como el reportado por Esteves et al. (2008).

La capacidad del toro Limousin de montar una respuesta anti-BoHV-1 quedó evidenciada luego de la infección con la cepa Uy-2004, sin embargo, la razón por la cuál no se detectó respuesta luego del aislamiento de la cepa Uy-1999 es aún desconocida.

En el ensayo realizado en la segunda parte de la tesis, si bien no se realizó el análisis de la composición del alimento suministrado, pensamos que el factor nutricional no afectó los resultados ya que todas las vacas ganaron peso durante el servicio y fueron sometidas a la misma dieta. La actividad cíclica de las vacas tampoco influyó en los resultados de la TP, ya que la respuesta encontrada a la sincronización no presentó diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.121$ ). La ganancia de peso, la actividad cíclica de las vacas y la actividad de monta de los toros son factores que han sido reportados por Dziuk & Bellows (1983) como limitantes en la TP en vacas de cría.

El comportamiento individual de cada toro podría haber afectado notoriamente el experimento ya que se utilizó un solo toro por grupo. Pero este factor fue controlado utilizando toros de la misma edad, raza, procedencia y con un examen andrológico que los catalogaba como aptos para la reproducción. La actividad de monta de los toros no presentó diferencias significativas ( $p= 0.171$ ). Basados en estos resultados, podemos afirmar que la TP no fue influenciada por factores nutricionales, la actividad cíclica de las vacas o el comportamiento reproductivo de los bovinos utilizados en el ensayo.

El 70 % (19/27) de las vacas del GIA fueron detectadas como seropositivas a los 30 días del comienzo del servicio lo que demuestra que la infección se difundió rápidamente. Hage et al. (1996) utilizaron también la serología como herramienta para monitorear la transmisión del virus en un rodeo seronegativo donde se introdujeron bovinos excretando BoHV-1 y encontraron que el 100 % de los bovinos expuestos seroconvirtió en 7 semanas. Sin embargo, las condiciones de alojamiento eran notoriamente diferentes, ya que los bovinos utilizados se encontraban en un sistema productivo intensivo, con un mayor contacto y no a campo como en nuestro ensayo.

Las posibles vías de infección en las vacas pueden haber sido tanto la respiratoria como la genital, ya que BoHV-1 fue aislado e identificado en el toro a partir de hisopados oculares, nasales, prepuciales y líquido seminal. La infección del toro que trabajó en el GIA se realizó únicamente por vía nasal y ocular y el virus fue excretado en secreciones de una zona alejada a la puerta de entrada lo que implica que se produjo viremia. Este hecho coincide con lo ya reportado por Engels & Ackerman (1996), ya que luego de la infección primaria el virus puede quedar restringido a un área local o distribuirse en órganos alejados de la puerta de entrada por viremia o a través de los axones de neuronas.

El virus se aisló del toro con infección aguda desde el día 2 al día 30 pi y las vacas que se infectaron en el GIA (19/27) fueron detectadas como positivas por serología desde el día 14 al día 30 del ensayo. Estos resultados demuestran que la infección con BoHV-1.1 se produjo en las primeras semanas del servicio, ya que como fue descrito previamente por Guy & Potgieter (1985a) la respuesta humoral puede detectarse por SN *in vitro* entre los 7 a 10 días pi. Si bien no se tomaron muestras para realizar aislamiento viral en las vacas que fueron infectadas, es probable, que estas puedan haber actuado como transmisoras del virus, favoreciendo la diseminación de la infección dentro del grupo, ya que Wentink et al.

(1993) han reportado que durante la infección primaria aguda el virus se excreta por 10 a 17 días y los títulos más altos son a los 4 a 6 días pi.

La prevalencia serológica varió durante el periodo del estudio (338 días) en el GIA, debido a que el 53 % de las vacas infectadas (seropositivas) se hicieron seronegativas en promedio aproximadamente entre 52 y 108 días pi. Si bien, la latencia viral no fue comprobada en estas vacas, está ampliamente documentado en la bibliografía que BoHV-1 induce latencia pi y que estos animales aparentemente sanos son capaces de excretar el virus y transmitirlo a bovinos susceptibles (Wentink et al. 1993; Engels & Ackerman 1996, Ackerman & Engels 2006). Por lo tanto, es altamente probable que las vacas detectadas como seropositivas y que por lo tanto fueron infectadas con BoHV-1.1, estén latentemente infectadas y constituyan una fuente de infección dentro del rodeo. Los resultados obtenidos por Deka et al. (2005) refuerzan esta idea ya que lograron aislar BoHV-1 en semen de 6 toros serologicamente negativos y aparentemente sanos. Basados en este antecedente y nuestros resultados podemos pensar que el hallazgo de un bovino seronegativo a BoHV-1 y latentemente infectado, que al principio se pensó que era un fenómeno individual, puede ser encontrado frecuentemente en la naturaleza.

Los títulos SN en vacas infectadas en condiciones naturales a nivel de campo, fueron notoriamente más bajos que los observados en la infección experimental de terneros con la misma cepa de BoHV-1.1. Por otro lado, las vacas que luego de la infección tuvieron un menor título de anticuerpos anti-BoHV-1, son las que se hicieron seronegativas más rápidamente. Estas diferencias en los títulos de anticuerpos pi fueron atribuidas por Van Oirschot et al. (1993) a la vía de infección, dosis infectante, cepa viral o factores individuales. La cepa de BoHV-1.1 que circuló en el GIA fue exactamente la misma que la utilizada en la infección experimental de los terneros y por lo tanto se asume que cepa viral no influyó. Es probable que la vía y la dosis infectante hayan ocasionado las diferencias observadas, sin embargo estos factores no pudieron ser evaluados en este ensayo.

Un aumento de cuatro diluciones en el título SN (4 a 64) fue detectado (días 87 y 147) y mantenido hasta el día 338 del ensayo en dos vacas del GIA. Hage et al. (1996) definen como criterio para detectar bovinos que se reinfectan con BoHV-1 que el título de anticuerpos aumente al menos dos diluciones y se mantenga un mínimo de dos semanas. Basados en esto, podemos afirmar que estas vacas tuvieron una reactivación viral o una reinfección. La evidencia de que la reactivación viral induce un aumento en el título SN ya ha sido demostrada por Ackerman & Wyler (1984). Si bien, es probable que el virus se haya reactivado por algún factor estresante, no necesariamente tiene que haberse excretado, ya que los anticuerpos pueden haber controlado la infección como han descrito Babiuk et al. (1996). Es poco probable que el virus haya comenzado a circular nuevamente en el GIA, ya que no se detectó seroconversión en las vacas no infectadas y el título SN de las seropositivas no aumentó de forma significativa. Sin embargo, esta posibilidad no puede ser descartada.

Las condiciones de aislamiento utilizadas fueron eficaces para prevenir la transmisión del virus entre los grupos, ya que el GC se ubicó en un potrero central del establecimiento que lindaba con los potreros del GS y el GIA, y no se detectó seroconversión en ninguno de los bovinos de este grupo. Mars et al. (2000) establecieron que una distancia mayor de 6.5 metros disminuye significativamente

las posibilidades de transmisión del virus a través de aerosoles. En nuestro experimento los grupos se encontraban separados por una distancia mínima de 8 metros y se tomaron medidas de bioseguridad para disminuir el riesgo de transmisión por fomites. Basados en lo antes descrito, podemos descartar que el aumento en el título SN de las dos vacas al día 87 y 147 del ensayo fuera ocasionado por una infección con una cepa de campo.

Al momento de comenzar el ensayo tuvimos que asumir que los bovinos que fueron incorporados mediante evaluación serológica (seronegativos), eran realmente no infectados con BoHV-1. Resultados anteriores muestran que debería ser evaluada la posibilidad de que un bovino seronegativo se encuentre latentemente infectado (Huck et al. 1971; Deas & Johnston. 1973; Van Oirschot et al. 1993; Alonzo et al. 2002). Sin embargo, esto sería difícil de implementar actualmente ya que tendríamos que inmunodeprimir a los bovinos y/o monitorear permanentemente con técnicas moleculares (PCR) para determinar que no son portadores del virus (Grom et al. 2006). Basados en estos antecedentes y con la metodología empleada en el presente trabajo, no podemos rechazar la posibilidad de que alguno de los bovinos utilizados estuviera latentemente infectado con BoHV. Lo que si podemos asegurar es que las vacas que se hicieron seropositivas fueron infectadas con BoHV-1.1 y por lo tanto se encontraban latentemente infectadas.

Nuestros resultados demuestran que en condiciones naturales la presencia de bovinos portadores de BoHV-1.1, que no son detectados por los test serológicos comúnmente utilizados, podría ser un fenómeno frecuente y debe ser considerado en la epidemiología de la enfermedad, ya que constituyen un riesgo importante para los países que llevan a cabo políticas de control o erradicación. Nylin et al. (1998) y Pritchard et al. (2003) han reportado brotes o reingreso de BoHV-1 en países que habían erradicado el agente, pero el origen de la infección no pudo ser determinado. Debe ser considerada entonces la posibilidad de que este tipo de bovinos puedan estar jugando un papel importante en la aparición espontánea de la enfermedad o en la re-introducción de BoHV-1 en países o predios donde se creía erradicada la enfermedad.

Durante todo el experimento la TP en el GIA fue inferior a la del GC. Sin embargo, las diferencias son significativas únicamente al momento de la segunda ecografía ( $p=0.0001$ ) realizada al día 52. Esta ecografía evaluó las vacas que quedaron gestadas entre los 21 y 25 días del experimento, momento en el que ya se había producido la infección con BoHV-1.1. Debido a la sincronización realizada las vacas observadas en estro entre el día 2 a 4 (patrón de respuesta en la sincronización con doble dosis de análogo sintético de  $PGF_{2\alpha}$  y que no quedaron gestadas en el GIA (20/27), repitieron el estro 19 a 21 días después (Dziuk & Bellows 1983). Por lo tanto, los dos primeros estros de las vacas del GIA se dieron al mismo tiempo que la circulación de BoHV-1.1 dentro del grupo. Solo 2 vacas lograron concebir en este periodo y se constató una reabsorción embrionaria. Varios trabajos han demostrado que la infección con BoHV-1.1 provoca endometritis, ooforitis, necrosis luteal y como consecuencia disminución de los niveles de progesterona que pueden ocasionar mortalidad embrionaria y afectar el siguiente ciclo estral (Miller & Van Der Maaten. 1983; Miller & Van Der Maaten. 1985; Miller & Van Der Maaten. 1986; Miller & Van Der Maaten. 1987). También se ha comprobado, que la utilización de vacunas vivas durante el estro en vaquillonas esta contraindicada, ya que produce

disminución en la tasa de concepción (Miller et al. 1989; Chiang et al. 1990). Los resultados obtenidos difieren de los descritos en un trabajo similar realizado por Parsonson & Snowdon (1975) quienes no encontraron pérdidas reproductivas luego del servicio por monta natural con un toro excretando BoHV-1.1. Sin embargo, se deben marcar diferencias con el trabajo de estos autores ya que el número de vacas servidas fue menor ( $n= 9$ ) y la cepa de BoHV-1 utilizada en ese momento posiblemente fuera del subtipo 1.2b que ha sido asociada fundamentalmente con IBP/IPV pero no con pérdidas reproductivas (Miller et al. 1991).

El 44 % (12/27) de las vacas del GIA logró concebir al final del periodo de servicio, ya que fueron detectadas como preñadas en la tercera ecografía (día 71). Como consecuencia la TP del GIA aumentó notoriamente y las diferencias con el GC desaparecieron. Algunos autores han señalado que la performance reproductiva no es afectada en vacas seropositivas y latentemente infectadas con BoHV-1 (Castro et al. 1991; Del Fava 2001). Probablemente, las vacas que se infectaron con BoHV-1.1 en las primeras tres semanas del servicio, desarrollaron una respuesta inmune, controlaron la infección y lograron concebir. Esta afirmación está basada en que la mayoría (83%) de las vacas que quedaron gestadas al final del servicio se encontraban infectadas con BoHV-1.1 (seropositivas).

En el cuadro VI se observa que en la primera ecografía la TP en las vacas seronegativas del GIA es similar a la observada en el GC y GS. Si bien, los resultados muestran claramente que durante las dos primeras ecografías la mayoría de las vacas infectadas con BoHV-1.1 (seropositivas) permanecían vacías, no fue posible establecer una asociación estadística entre estas dos condiciones. Sin embargo, al momento de la segunda ecografía, el valor de  $p= 0.072$  indicó una tendencia a que los resultados no sean debidos al azar. Es probable que si las diferencias encontradas se mantuvieran y el número de vacas del ensayo hubiera sido mayor, se podría haber establecido una asociación entre vacas infectadas con BoHV-1.1 y ausencia de gestación.

Si bien, el toro del GIA presentó síntomas leves pi, se han descrito alteraciones en la calidad seminal que pueden haber influenciado los resultados de la TP. Deas & Johnston. (1973) describieron disminución en la motilidad y la sobrevivencia de espermatozoides en el semen de toros infectados con BoHV-1. En este trabajo, la calidad seminal no fue monitoreada durante el periodo de servicio, por lo que no podemos descartar una posible influencia de este factor en los resultados obtenidos. Sin embargo, esto es discutible ya que otros autores no encontraron alteraciones seminales pi y se ha reportado la excreción intermitente de BoHV-1 en el semen de toros utilizados en centros de inseminación sin consecuencias en la calidad seminal (Huck et al. 1971; White & Snowdon. 1973; Van Oirshot et al. 1993).

En el toro del GS, el título SN no varió en más de dos diluciones durante el servicio y BoHV-1 no fue aislado de hisopados o secreciones. Por lo tanto, el trabajo de monta durante el servicio no fue suficiente estrés como para que un toro seropositivo y latentemente infectado reactivara el BoHV-1 como para re-estimular la respuesta inmune humoral.

La TP del GS no presentó diferencias con el GC, lo que indica que el virus del toro GS no se re-excretó y por lo tanto no se transmitió a las vacas durante el servicio, por lo que no se produjeron pérdidas reproductivas. Estos resultados

estarían de acuerdo con los obtenidos en un experimento similar por Parsonson & Snowdon (1975). En Uruguay, los toros han sido propuestos como importantes transmisores de la enfermedad debido a la alta prevalencia serológica encontrada en esta categoría (Repiso et al. 2005). Sin embargo, en nuestro experimento, la transmisión de la infección durante el servicio a través de la monta natural utilizando un toro latentemente infectado con BoHV-1.1 no fue comprobada. Es probable que los anticuerpos neutralizantes presentes al momento del servicio hayan jugado un papel importante en el control de la reactivación y excreción del virus como ya fue reportado por Babiuk et al. (1996). Si bien esto es un hecho demostrado, también se ha documentado la excreción intermitente de BoHV-1 en el semen de toros seropositivos latentemente infectados (Van Oirshot et al. 1995). Hage et al. (1996) logran con la introducción de bovinos latentemente infectados e inmunodeprimidos mediante la administración de corticoides, la difusión de la infección dentro de un rodeo de forma rápida, detectándose seroconversión específica en bovinos negativos y aumento del título en los seropositivos. Por lo tanto, esta claro que estos bovinos son un potencial riesgo para la transmisión del virus cuando son utilizados para el servicio.



## **7. CONCLUSIONES**

- 7.1. El toro Limousin permaneció serológicamente negativo y latentemente infectado con BoHV-1 por 5 años post-infección.
- 7.2. Se demostró la capacidad de la cepa Uy-1999 para inducir una respuesta humoral detectable post-infección, sin embargo resultó menos inmunogénica que la cepa de referencia Los Angeles.
- 7.3. La super-infección natural de un mismo bovino con diferentes subtipos de BoHV-1 fue demostrada.
- 7.4. El ingreso a un rodeo de cría de un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.1 provoca la transmisión del virus de forma rápida y la mayoría de las vacas expuestas se infectaron.
- 7.5. No se detectó la transmisión del virus en vacas de cría servidas con un toro latentemente infectado con BoHV-1 (seropositivo).
- 7.6. En condiciones de campo similares a las utilizadas en nuestro sistema de cría, la tasa de preñez fue afectada únicamente cuando se utilizó para el servicio un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.
- 7.7. Bovinos infectados con BoHV-1 y que no son detectados por los test serológicos comúnmente utilizados, podrían ser encontrados frecuentemente en la naturaleza, constituyendo probablemente un riesgo epidemiológico para el control y/o erradicación de la enfermedad.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

El desarrollo de metodologías que permitan identificar fácilmente animales latentemente infectados con BoHV-1 y sin anticuerpos detectables por las técnicas serológicas empleadas habitualmente para el diagnóstico de la infección, ayudará a mejorar el control y prevención de esta enfermedad.

Poseer aislamientos autóctonos de BoHV-1 permitirá compararlos con cepas de la región y realizar estudios epidemiológicos que ayuden a comprender la circulación del virus en nuestro país y la región.

Se necesitan más estudios para poder determinar si la cepa Uy-1999 es realmente menos inmunogénica.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ackermann M, Belak S, Bitsch V, Edwards V, Moussa A, Rockborn G, Thiry E. (1990a). Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Vet Microbiol* 23:361-363.
2. Ackermann M, Muller HK, Bruckner L, Kihm U. (1990b). Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: reviews and prospects. *Vet Microbiol* 23:365-370.
3. Ackermann M. & Engels M. (2006). Pro and contra IBR - eradication. *Vet Microbiol* 113:293-302.
4. Ackerman M, Peterhans E, Wyler R. (1982). DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am J Vet Res* 43:36-40.
5. Ackerman M & Wyler R. (1984). The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet Microbiol* 9:53-63.
6. Alonzo P, Benavides U, Isnardi F, Puentes R, Carol H, Clavijo A, Del Campo R, Bonnevaux J, Weiblen R, Fondevila N, Romera S, Sadir A, Maisonnave J. (2002). Caracterización de un herpesvirus 1.1 (HVB-1.1) aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)* 37:15-22.
7. Alonzo P, Benavidez U, Isnardi F, Puentes R, Maisonnave J. (2004). Lack of specific immune response after BHV infection. In: Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congress of Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (Montreal-Canada), Ed. Medimond, Immunology 2004, Bologna, pp. 161-164.
8. Babiuk L, Van Drunen L, Tikoo S. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
9. Bielanski A & Dubuc C. (1994). In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus 1 (BHV-1). *Theriogenology* 41:1211-1217.
10. Bielanski A, Singh E.L, Hare WCD. (1987). Effect of bovine rhinotracheitis virus (IBRV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on survival of prehatched bovine embryos. *Theriogenology* 27:214.
11. Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. (1999). Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 51:875-881.
12. Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkvens DL. (2005). Risk factors for bovine herpesvirus 1 seropositivity. *Prev Vet Med* 69:285-295.
13. Bowen R, Elsdon R, Seidel G. (1985). Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 46:1095-1097.
14. Brar JS, Johnson DW, Muscoplat CC, Shope RE, Meiske JC. (1978). Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine diarrhea viruses: duration and effect on vaccination in young calves. *Am J vet Res* 39:241-244.
15. Castro RSL, Abreu JJ, Coelho SG, Freitas C. (1991). Reproductive performance of serum positive bovine embryo donors naturally infected by BHV-1 and/or BVD viruses. *Rev Bras Reprod Anim* 15:191-198.

16. Castrucci G, Wada EM, Ranucci S, Frigeri F, Cilli v, Pedini B, Tesei B, Arush MA. (1980). Reactivation of latent infection by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Microbiologica* 3:307-318.
17. Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Soares GC, Meyer R, Sardil S. (2000). Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 37-6:497-500.
18. Chiang BC, Smith PC, Nusbaum KE. (1990). The effect of infectious bovine rhinotracheitis vaccine on reproductive efficiency in cattle vaccinated during estrus. *Theriogenology* 33:1113-1120.
19. Cho H, Entz S, Green G, Jordan L. (2002). A blocking ELISA with improved sensitivity for the detection of passively acquired maternal antibodies to BHV-1. *Can Vet J* 43:43-45.
20. Cortez A, Heinemann MB, Alfieri AA, Medidi KC, Alfieri AF, Oliveira DB, Meyer AD, Soares RM, Sakamoto SM, Amaral R, Bruselli PS, Fujii T, Richtzenhain LJ. (2001). Comparacao das técnicas de ELISA indireto e de seroneutralizacao na deteccao de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). *Braz J Vet Anim Sci* 38:146-148.
21. D'Arce RCF, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, Ams CW. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88:315-334.
22. Darcel CQ & Dorward WJ. (1975). Recovery of infectious bovine rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment of vaccinated animals. *Can Vet J* 16-3:87-88.
23. Davison AJ. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet microbiol* 86:69-88.
24. De Wit WJ, Hage JJ, Brinkhof J, Westenbrink F. (1998). A comparative study of serological test for use in the bovine herpesvirus 1 eradication program in the Netherlands. *Vet Microbiol* 61:153-163.
25. Deas DW. & Johnston WS. (1973). The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Vet Rec* 92:636-639.
26. Del Fava C. (2001). Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e nao infectados pelo herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1). Tesis de doctorado en Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Pablo, Brasil.
27. Denis M, Kaashoek MJ, Van Oirshot JT, Pastoret PP, Thiry E. (1994). Quantitative assesment of the specific CD4+ T limphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune cattle. *Vet Imm Immunopathol* 42:275-286.
28. Dennet DP, Barasa JO, Johnson RH. (1976). Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res Vet Sci* 20:77-83.
29. Deka D, Ramneek Maiti NK, Oberoi MS. (2005). Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 24:1085-1094.
30. Descoteaux L, Cécyre D, Elsener J, Beauchamp G. (2003). Comparison of humoral immune responses in dairy heifers vaccinated with 3 different commercial vaccines against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus 1. *Can Vet J* 44:816-821.

31. Deregt D, Cho HJ, Kosub GC. (1993). A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus 1 antibodies. *Can J Vet Res* 57:56-59.
32. Durham PJK, Hassard LE, Van Donkersgoed J. (1991). Serological studies of infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine viral diarrhoea, and bovine respiratory syncytial viruses in calves following entry to a bull test station. *Can Vet J* 32:427-429.
33. Dziuk, P.J. & Bellows, R. A. (1983) Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. *J. Anim. Sci. (Suppl. 2):355-379.*
34. Easton MC. (2006). Estudio patológico de las principales causas de aborto bovino en Uruguay. Tesis de maestría en Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
35. Edwards S, Woods SB, Westcott G, Emmerson M, Jones PC, Phillips AJ. (1986). An evaluation of five serological test for the detection of antibody to bovine herpesvirus 1 in vaccinated and experimentally infected cattle. *Res Vet Sci* 41:378-382.
36. Elazhary MASY, Lamothe P, Slim A, Roy RS. (1980). Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. *Can Vet J* 21:336-339.
37. Engels M, Ackermann M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 53:3-15.
38. Esteves PA; Dellagostin OA; Pinto LS; Silva AD; Spilki FR; Ciacci-Zanella JR; Hübner SO; Puentes R; Maisonnave J; Franco AC; Rijsewijk FAM; Batista HBCR; Teixeira TF; Dezen D; Oliveira AP; David C; Arns CW; Roehe PM. (2008). Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Research* 131:16-22.
39. Esteves PA, Spilki FR, Silva AC, Oliveira EA, Moojen V, Esmeraldino AM, Roehe PM. (2003). Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec* 152:658-659.
40. Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA. (1993). *Veterinary Virology*, Ed. Academia Press, 2<sup>nd</sup> edition.
41. Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, Burge LJ, Duff GC. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV 1b, BVDV 2, bovine herpesvirus 1, parainfluenza 3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 22:643-649.
42. Fulton RW, Confer AW, Burge LG. (1995). Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza 3 virus and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine* 13:725-733.
43. Graat EAM, De Jong MCM, Frankena K, Franken P. (2001). Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Vet Microbiol* 79:193-208.
44. Graham DA, McShane J, Mawhinney KA. (1998). 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* 10:43-48.
45. Grom J, Hostnik P, Toplak I, Barlic-Maganja D. (2006). Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet J* 171:539-544.
  46. Guarino H, Maisonnave J, Capano F, Pereira J. (1982). Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 83:131-134.
  47. Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med* 85:34-40.
  48. Gupta PK, Saini M, Gupta LK, Rao SK, Bandyopadhyay SK, Butchaiah G, Garg GK, Garg SK. (2001). Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology* 78:293-305
  49. Guy JS, Potgieter LND, Mc Cracken M, Martin W. (1984). Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of the bovine udder. *Am J Vet Res* 45:783-785.
  50. Guy JS & Potgieter LND. (1985a). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res* 46:893-898.
  51. Guy JS & Potgieter LND. (1985b). Kinetics of antibody formation after the reactivation of bovine herpesvirus 1 infection in cattle. *Am J Vet Res* 46:899-904.
  52. Hage JJ, Schukken YH, Barkema HW, Benedictus G, Rijsewijk FAM, Wentink GH. (1996). Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet Microbiol* 53:169-180.
  53. Hage JJ, Schukken YH, Schols H, Maris-Veldhuis MA, Rijsewijk FA, Klaassen CH. (2003). Transmission of bovine herpesvirus 1 within and between herds on an island with a BHV-1 control programme. *Epidemiol Infect.* 130:541-552.
  54. Hanon E, Vanderplasschen A, Lyaku J, Keil G, Denis M, Pastoret P. (1996). Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic T cell death of mitogen stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology* 70:4116-4120.
  55. Henderson LM. (2005). Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals* 33:203-209.
  56. Henderson LM, Katz JB, Erickson GA, Mayfield JE. (1990). In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gen deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 51:1656-1662.
  57. Homan EJ, Easterday BC. (1980). Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am J Vet Res* 41:1212-1213.
  58. House JA & Baker JA. (1971). Bovine herpesvirus IBR/IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet* 61:320-335.
  59. Huck RA, Millar PG, Evans DH. (1971). Phenopostitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Vet Rec* 88:292-297.
  60. Huck RA, Millar PG, Woods DG. (1973). Experimental infection of maiden heifers by the vagina with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus. *J Comp Pathol* 83:271-279.

61. Hutchings D, Van Drunen Littel S, Van Den Hurk, Babiuk L. (1990). Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *Journal of Virology* 64:5114-5122.
62. Jones C, Newby TH, Holt T, Doster A, Stone M, Ciacci-Zanella J, Webster CJ, Jackwood MW. (2000). Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). *Vaccine* 18:3185-3195.
63. Jones C. (2003). Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* 16-1:79-95.
64. Kaashoek M, Straver PJ, Van Roig EMA, Quack J, Van Oirshot J. (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet Rec* 139:416-421.
65. Karhs R. (1977). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *JAVMA* 171:1055-1064.
66. Katz JB, Henderson LM, Erickson GA. (1990). Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. *Vaccine* 8:286-288.
67. Kendrick JW, Schneider I, Straub OC. (1971). Placental reaction to the infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus. *Am J Vet Res* 32 :1045-1051.
68. Kendrick JW. (1973). Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. *J Am Vet Med Ass* 163:852-854.
69. Kendrick JW & Straub OC. (1967). Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus infection in pregnant cows. *Am J Vet Res* 28 :1269-1282.
70. Kramps JA, Quak S, Weerdmeester K, Van Oirshot JT. (1993). Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet microbiol* 35:11-21.
71. Kramps JA, Magdalena J, Quak S, Weerdmeester K, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, Rijsewik FAM, Keil G, Van Oirshot JT. (1994). A simple, specific and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol* 32:2175-2181.
72. Kupfershmid HU, Kihm U, Bachman P, Muller KH, Ackerman M. (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology* 25:439-443.
73. Lehmann D, Sodoyer R, Leterme S, Crevat D. (2002). Improvement of serological discrimination between herpesvirus infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. *Vet Microbiol* 86:59-68.
74. Lemaire M, Meyer G, Baranowsky E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P, Thiry E. (2000b). Production of bovine herpesvirus type 1 seronegative latent carriers by administration of a live attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol* 38:4233-4238.
75. Lemaire M, Meyer G, Ernst E, Vanerreweghe V, Limbourg B, Pastoret P, Thiry E. (1995). Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by calostrical immunity. *Vet Rec* 137:70-71.
76. Lemaire M, Pastoret P, Thiry E. (1994). Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann Med Vét* 138:167-180.
77. Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ, Thiry E. (2000a). Effects of Bovine Herpesvirus Type 1 Infection in Calves with Maternal

- Antibodies on Immune Response and Virus Latency. *J Clin. Microbiol* 38:1885-1894.
78. Madin SH, York CJ, Mickercher DG. (1956). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 124:721-722.
  79. Maisonnave J, Alonzo P, Puentes R, Esteves PA, Silva AD, Roehe PM. (2005). Natural co-infection of a bull with two different subtypes of Bovine Herpesvirus 1. *Encuentro Nacional de Virología XVI, Salvador, Bahia-Brasil.*
  80. Manual de Standards para Test Diagnósticos y Vacunas (2000). Elaborado por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), Cuarta edición, capítulo 2.3.5:1381-1439.
  81. Mars MH, Brusckhe C, Van Oirschot J. (1999). Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol* 66:197-207.
  82. Mars MH, De Jong MCM, Van Maanen C, Hage JJ, Van Oirschot JT. (2000). Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infection in calves under field conditions. *Vet Microbiol* 76:1-13.
  83. Medici KC, Alfieri AA, Alfieri AF. (2000). Ensaio imunoenzimatico comercial no diagnostico sorologico das infeccoes por herpesvirus bovino 1. *Ciencia Rural* 30:343-346.
  84. Menanteau-Horta AM, Ames TR, Johnson DW, Meiske JC. (1985). Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. *Can J Comp Med* 49:10-14.
  85. Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 85:57-69.
  86. Meurens F, Schynts F, Keil GM, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, Thiry E. (2004a). Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J Virol* 78:3872-3879.
  87. Meurens F, Keil GM, Muylkens B, Gogev S, Schynts F, Negro S, Wiggers L, Thiry E. (2004b). Interspecific recombination between two ruminant herpesviruses, bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol* 78:9828-9836.
  88. Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, Coignoul E, Belak S, Thiry E. (2001). Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol* 146:633-652.
  89. Miller JM, Van Der Maaten MJ. (1984). Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 45:790-794.
  90. Miller JM & Van Der Maaten MJ. (1985). Effect of primary and recurrent infections bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *Am J Vet Res* 46:1434-1437.
  91. Miller JM & Van Der Maaten MJ. (1986). Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res* 47:223-228.
  92. Miller JM & Van Der Maaten MJ. (1987). Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am J Vet Res* 48:1555-1558.
  93. Miller JM, Van Der Maaten MJ, Whetstone CA. (1989). Infertility in heifers inoculated with modified-live bovine herpesvirus -1 vaccinal strain against infectious bovine rhinotracheitis on postbreeding day 14. *Am J Vet Res* 50:551-554.

94. Miller JM, Whetstone C, Van Der Maaten MJ. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-461.
95. Misra V, Babiuk LA, Darcel CL. (1983). Analysis of bovine herpes virus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch. Virol.* 76(4): 341-354.
96. Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Bardon JC, Silva-Paulo P, Paolichi FA, Cipolla AL. (2003). Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 35:143-148.
97. Motha MXJ & Hansen MF. (1998). Prevalence of IBR, Pi3, BRS and BCV infections in the dairy cattle population of New Zealand. *N Zea Vet J* 46:239-240.
98. Nardelli S, Farina G, Lucchini R, Valorz C, Moresco A, Dal Zotto R, Costanzi C. (2008). Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). *Prev Vet Med* 85:68-80.
99. Narita M, Inui S, Nanba K, Shimitzu Y (1981). Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. *Am J Vet Res* 42:1192-1197.
100. Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiainen M. (2007). Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet Scan* 49-3:147-152.
101. Nylin B, Madsen KG, Ronsholt L. (1998). Reintroduction of bovine herpesvirus type 1 into Danish cattle herds during the period 1991-1995: a review of the investigations in the infected herds. *Acta Vet Scand* 39:401-413.
102. Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-López J. (1999a). Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med* 41:271-278.
103. Obando RC, Bauloe C, Pedrique C, Veracierta C, Belak S, Merza M, Moreno-Lopez J. (1999b). Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Acta Vet Scan* 40:253-262.
104. Odeon AC, Leunda MR, Fernandez IJ, Perez se, Spath EJA. (2000). Serological survey of bovine pathogens in the southeast of buenos Aires Province, Argentina. XXI World Buiatrics Congress, Punta del Este Uruguay 162, 94.
105. Owen NV, Chow TL, Molello JA. (1964). Bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 25:1617-1625.
106. Parsonson I & Snowdon W. (1975). The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust Vet J* 51:365-369.
107. Pastoret P, Thiry E, Brochier B, Derboven G. (1982). Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vet* 13:221-235.
108. Pastoret P & Thiry E. (1985). Diagnosis and profilaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immun Infect Dis* 8:35-42.
109. Pastoret P, Aguilar-Setien A, Burtonboy G, Mager J, Jetteur P, Shoenars F. (1979). Effect of repeated treatment whit dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rinotracheitis virus and humoral immune response. *Vet Microbiol* 4:149-155.



110. Paton DJ, Christiansen KH, Alenius S, Cranwell MP, Pritchard GC, Drew TW. (1998). Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet Rec* 11:385-391.
111. Penny CD, Howie F, Nettleton PF, Sargison ND, Shock A. (2002). Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine rhinotracheitis virus type 1. *Vet Rec* 151:89-91.
112. Perrin B, Bitsch V, Cordioli P, Edwards S, Eliot M, Guerin B, Lenihan P, Perrin M, Ronsholt L, Van Oirschot JT, Vanopdenbosh E, Wellemans G, Thibier M. (1993). A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 12:969-984.
113. Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, Noretto EO, Etcheverrigaray ME. (1999a). Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *J Vet Med B* 46:453-456.
114. Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray ME. (1999b). Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 19-1/2 :40-50.
115. Pinto GB, Hawkes P, Zabal O, Ulloa E, Lager IA, Weber EL, Schudel AA. (1993). Viral antibodies in bovine fetus in Argentina. *Res Vet Sci* 55:385-388.
116. Pospisil Z, Krejčí J, Jínek P, Lány P, Zendulková D, Cíhal P. (1996). Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet microbiol* 53 :199-206.
117. Pritchard GC, Banks M, Vernon RE. (2003). Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in dairy herd of high health status. *Vet Rec* 153:113-117.
118. Puentes R, Alonzo P, Benavides U, Silva AD, Esteves PA, Roehle PM, Maisonnave J. (2007). Primer aislamiento de herpesvirus bovino 1 subtipo 2 (HVB-1.2) en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 42-168:9-13.
119. Ramneek DD, Maiti NK, Oberoi MS. (2005). Detection of bovine herpesvirus 1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 24:1085-1094.
120. Reed LV & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
121. Renjifo X, Letellier C, Keil G, Ismaili J, Vanderplassen A, Michel P, Godfroid J, Walravens K, Charlier G, Pastoret P, Urbain J, Denis M, Moser M, Kerkhofs P. (1999). Susceptibility of bovine antigen-presenting cells to infection by bovine herpesvirus 1 and in vitro presentation to T cells: Two independent events. *Journal of Virology* 73:4840-4846.
122. Repiso MV, Gil A, Bañales P, D' Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 40:5-28.
123. Rivero R, Haedo F, Feola R. (1987). Granuloma Nasal Bovino: descripción de un caso colectivo y discusión sobre su probable etiología. *Veterinaria (Montevideo)* 98:5-11.
124. Rocha MA, Gouveia AMG, Lobato ZIP, Leite RC. (2001). Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais 1990-1999. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53-6:645-647.

125. Rocha MA, Barbosa EF, Guimaraes SEF, Neto ED, Gouveia AMG. (1998) A high sensitivity –nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected Bulls. *Vet Microbiol* 63:1-11.
126. Rodger SM, Murray J, Underwood C, Buxton D. (2007). Microscopical lesions and antigen distribution in bovine fetal tissues and placentae following experimental infection with bovine herpesvirus 1 during pregnancy. *J Comp Path* 137:94-101.
127. Rodriguez LL, Homan EJ, Easterday BC. (1984). Characterization of bovine herpesvirus 1 isolated from trigeminal ganglia of clinically healthy cattle. *Am J Vet Res* 45:1069-1072.
128. Roizman B, Desroisiers R, Fleckenstein B. (1992). The family herpesviridae: an update. *Arch Virol* 123:425-449.
129. Rossi CR, Kiesel GK, Rumph PF. (1982). Association between route of inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus and site of recrudescence after dexamethasone treatment. *Am J Vet Res* 43:1440-1442.
130. Rouse BT & Babiuk LA. (1974). Host defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis: In vitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. *Infect Immun* 10:681-687.
131. Rutten VPMG, Wentink GH, De Jong WAC, Van Exsel ACA, Hensen EJ. (1990). Determination of BHV-1 specific immune reactivity in naturally infected and vaccinated animals by lymphocyte proliferation assay. *Vet Immunol Immunopathol* 25:259-267.
132. Sarca M, Barboi G, Tanansa E, Iancu E. (1998). Immunoenzymatic method for the serodiagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Stud Res Vet Med* 7:29-35.
133. Saizar J. (1997). Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa-IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 133:4-7.
134. Sanpedro D, Galli I, Vogel O. (2003). Condición corporal una herramienta para planificar el manejo del rodeo de cría. *Serie técnica INTA, Buenos Aires-Argentina* n° 30:10-12.
135. Schynts F, Meurens F, Detry B, Vanderplasschen A, Thiry E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J Virol* 77:12535-12542.
136. Schwyzer M, Ackermann M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 53:17-29.
137. Sheffy BE & Rodman S. (1973). Activation of latent infection bovine rhinotracheitis infection. *J Am Vet Med Assoc* 163:850-851.
138. Smith PC, Nusbaum KE, Kwpien RP, Stringfellow DA, Driggers K. (1990). Necrotic oophoritis in heifers vaccinated intravenously with infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine during estrus. *Am J Vet Res* 51-7:969-972.
139. Snowdon WA. (1965). The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust Vet J* 41:135-142.
140. Spilki FR, Esteves PA, De Lima M, Franco AC, Chiminazzo C, Flores EF, Weiblen R, Driemeier D, Roehe PM. (2004). Comparative pathogenesis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq Vet Bras* 24-1:43-49.

141. Stahl K, Rivera H, Vagsholm I, Moreno-lopez J. (2002). Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Perú. *Prev Vet Med* 56:193-202.
142. Stata Corp. (2007). *Stata statistical software: release 10*, College station TX: Stata Corp. LP.
143. Strube W, Auer S, block W, Heinen E, Kretzdorn D, Rodenbach C, Schmeer N. (1996). A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet Microbiol* 53:181-189.
144. Thiry E, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A, Schynts F. (2006). Recombinants in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113:171-177.
145. Thiry E, Saliky J, Pastoret P, Lamberty AF, Ligot J. (1984). Failure to demonstrate infectious bovine rhinotracheitis virus reactivation in parturient cows. *Vet Rec* 8:248-249.
146. Thiry E, Saliky J, Bublot M, Pastoret P. (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Com Immun Microbiol Infect Dis* 10:59-63.
147. Tikoo S, Campos M, Babiuk L. (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45:191-223.
148. Turin L, Russo S, Poli G. (1999). BHV-1: New molecular approaches to control and widespread infection. *Mol Med* 5:261-284.
149. Van Der Maaten MJ, Miller JM, Whetstone CA. (1985). Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding. *Am J Vet Res* 46:1996-1999.
150. Van Der Maaten MJ & Miller JM. (1984). Ovarian lesions in heifers exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus by non genital routes on the day after breeding. *Vet Microbiol* 10:155-163.
151. Van Donkersgoed J, Van den Hurk JV, Mc Cartney D, Harland R. (1991). Comparative serological responses in calves to eight commercial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses. *Can Vet J* 32:727-733.
152. Van Drunen Littel-Van Den Hurk S. (2006). Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113:275-282.
153. Van der Engelenburg FAC, Maes R, Van Oirschot JT, Rijsewijk F. (1993). Development of a rapid and sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol* 31:3129-3135.
154. Van der Engelenburg FAC, Van Shie FW, Rijsewijk FAM, Van Oirschot JT. (1995). Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J Clin Microbiol* 33:308-312.
155. Van Oirschot JT. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 17:29-33.
156. Van Oirschot JT. (1999). Bovine viral vaccines, diagnosis and eradication: past, present and future. *Adv Vet Med* 41:197-216.
157. Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JAH, Quack J, Westenbrink F, Van Exel ACA. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 132:32-35.
158. Vanroose G, De Kruif A, Van Soom A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *An Reprod Sci* 60:131-143.

159. Van Shaik G, Schukken YH, Nielen M, Dickjuizen AA, Huirne RBM. (1999). Application of survival analysis to identify management factors related to the rate of BHV-1 seroconversions in a retrospective study of dutch dairy farms. *Livestock Production Science* 60:371-382.
160. Vieira S, Diederichsen WME, Souza WJ, Alfaia BT, Correia L. (2003). Anticorpos para herpesvirus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goias. *Cien Anim Bras* 4-2:131-137.
161. Vogel FSF, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Moraes MP, Braganca JFM. (2004). Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet Microbiol* 98:185-196.
162. Wagter L, Glas R, Bleumink Pluym N, Van der Engelenburg FAC, Rijsewijk FAM, Houwers D. (1996). A polimerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in selectively digested whole bovine semen. *Vet Res Commun* 20:401-408.
163. Weiblen R, Kreutz LC, Canabarro TF, Schuch LF, Rebelatto M (1992). Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest* 4:341-343.
164. Wentink GH, Rutten VPMG, Van exel ACA, De Jong WAC, Vleugel H, Hensen EJ. (1990). Failure of an in vitro linphoproliferative assay specific for bovine herpesvirus type 1 to detect immunized or latently infected animals. *Vet Q* 12:175-182.
165. Wentink GH, Van Oirshot JT, Verhoeff J. (1993). Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV-1): a review. *Vet Q* 15:30-33.
166. Whestone CA & Miller JM. (1989). Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* 107:27-34.
167. Whestone CA, Miller JM, Bortner D, Van Der Maaten M. (1989a). Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* 7:527-532.
168. Whestone CA, Miller JM, Bortner D, Van Der Maaten M. (1989b). Changes in the bovine herpesvirus genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch Virol* 106:261-279.
169. White M & Snowdon W. (1973). The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust Vet J* 49:501-506.
170. Winkler MT, Doster A, Jones C. (2000). Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of infected calves. *J Virol* 74:5337-5346.
171. Xia QJ, Yason CV, Kibenge FSB. (1995a). Comparison of Dot Blot Hybridization, Polimerase Chain Reaction, and Virus Isolation for detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can J Vet Res* 59:102-109.
172. Xia QJ, Yason CV, Kibenge FSB. (1995b). Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot blot hybridization, polimerase chain reaction and virus isolation. *Res Vet Sci* 59:183-185.

173. Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Herbert JM, Hass JM, Frank NE, Luempert lii LG, Chase CC. (2007). Efficacy bovine herpesvirus 1 inactivated vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. J Am Vet Med Assoc 231:1386-1389.