

Efecto de la infección con *Herpesvirus bovino 1* sobre el porcentaje de preñez de vacas de cría en Uruguay

Effect of *Bovine Herpesvirus 1* infection on pregnancy rate of beef cows in Uruguay



Alonzo, P.¹, Puentes, R.², Benavides, U.², Iznardi, F.², García, R.³, Piaggio, J.⁴, Cavestany, D.⁵, Roses, G.⁵, Maisonnave, J.²

RESUMEN

La infección de vacas con *Herpesvirus bovino 1.1* (BoHV-1.1) está asociada a infertilidad y abortos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión del virus durante el servicio a campo de vacas de cría seronegativas, utilizando toros infectados con BoHV-1.1 y determinar si el porcentaje de preñez se vio afectado. Las vacas (n = 83) fueron distribuidas al azar en tres grupos: grupo control (GC) servidas con el toro seronegativo, grupo seropositivo (GS) servidas con un toro infectado 60 días antes del servicio (seropositivo) y grupo infectado agudo (GIA) servidas con un toro infectado al momento de comenzar el servicio. La detección de anticuerpos neutralizantes (SN) anti-BoHV-1 fue utilizada como indicador de infección. La evolución del porcentaje de preñez fue evaluada mediante ecografía y tacto rectal hasta los 180 días. La circulación de BoHV-1 se demostró únicamente en el GIA, detectándose anticuerpos SN en el 70% de las vacas. A los 52 días el porcentaje de preñez del grupo GIA (33%) fue menor que el del GC (86%) encontrándose diferencias significativas $P < 0,0001$. No se encontraron diferencias entre el GS y el GC. El porcentaje de preñez fue afectado negativamente, durante los 2 primeros ciclos estrales, únicamente cuando se utilizó para el servicio un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.

Palabras clave: infección natural, BoHV-1, porcentaje de preñez

SUMMARY

Bovine herpesvirus type 1.1 (BoHV-1.1) can cause infertility and abortions. The objective of the present work was to evaluate the viral transmission with the use of BoHV-1 infected bulls and its influence in the pregnancy rate. Eighty three cows were divided in 3 groups: negative control group (GC) was mated with a seronegative bull, seropositive group (GS) with a seropositive latently infected bull (infected 60 days prior to the experiment) and a third group with a bull with BoHV-1.1 acute infection (GIA). BoHV-1 seroneutralizing antibody detection was used as indication of viral infection. Conception was diagnosed by ultrasonography and rectal palpation every 30 days until 180 days after the end of the breeding period. BoHV-1.1 was rapidly transmitted in the GIA group as specific antibodies were detected in 70% of the cows in the first 30 days of the experiment. At 52 days, the GIA group had a lower pregnancy rate (33%) than the GC group (86%; $P < 0.001$). There were no significant differences on the pregnancy rates between the GS and GC groups. Reproductive losses were observed during the first two cycles only with the BoHV-1 acute infected bull.

Key words: natural infection, bovine Herpesvirus BoHV-1, pregnancy rate

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, así como en la mayoría de los países del mundo, la infección con *Herpesvirus bovino 1* (BoHV-1) está ampliamente distribuida. El 99.1% de los establecimientos ganaderos posee al menos un animal positivo y la prevalencia serológica fue estimada en 36,6% (Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008). La prevalencia por categorías es de 11% en vaquillonas, 44% en vacas y 87% en toros. En base a estos resultados, se identifica la época de servicio como un evento importante para la transmisión del virus en 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 (Repiso y col., 2005).

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 y Ackermann, 1996). La infección genital ocurre por contacto directo o a través de semen contaminado (Snowdon 1965; Huck

y col., 1971; Deas y Johnston, 1973; Parsonson y Snowdon, 1975; Dennet y col., 1976).

La transmisión indirecta puede ocurrir por agua, alimentos o fomites contaminados. La inactivación del virus en el ambiente varía según la temperatura, pH, luz y humedad. En ambientes cálidos puede permanecer por 5 a 13 días y es sensible a desinfectantes derivados del fenol, amonios cuaternarios y formaldehído (Wentink y col., 1993).

Cuando la infección primaria se produce por vía respiratoria, el virus es usualmente excretado por secreciones nasales y oculares, sin embargo cuando se produce viremia, puede excretarse también por secreciones vaginales o por semen. Si la infección fue por 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-1.1 por la replicación del virus en la mucosa de pene, prepucio y probablemente en la

¹DILAVE, MGAP, Uruguay.

²Área de Inmunología, Departamento Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

³Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

⁴Departamento de Bioestadística y Bioinformática, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

⁵Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Uruguay. Correo electrónico: jacmaiso@gmail.com o jacmaiso@fvet.edu.uy

Recibido: 20/4/12 Aprobado: 7/5/12

Alonzo, P. y col.

parte distal de la uretra y puede ser excretado por días o semanas (Snowdon, 1965).

Trabajos previos similares al nuestro indican que la infección con BoHV-1 a través de la monta natural en vacas no parece afectar la fertilidad (Parsonson y Snowdon, 1975). Sin embargo, se han comunicado problemas de fertilidad en rodeos seropositivos que han utilizado toros de los cuales se ha aislado BoHV-1 en semen (Biuk-Rudan y col., 1999). Miller y van der Maaten (1986) demostraron que la mortalidad embrionaria observada luego de la infección primaria con BoHV-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) y a la necrosis luteal ocasionada por el proceso inflamatorio a nivel de ovario. En vacas seropositivas a BoHV-1 y sin historia de vacunación (latentemente infectadas), los índices reproductivos y el desempeño productivo no mostraron diferencias respecto a vacas seronegativas, por lo tanto, estos indicadores no fueron influenciados por esta condición (Del Fava, 2001).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión a campo de BoHV-1 y el efecto sobre el porcentaje de preñez, en vacas de cría seronegativas, utilizando toros infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación: Se utilizaron 83 vacas de raza Hereford de más de 4 años, con antecedente de parto previo y que se encontraban vacías y ciclando (presencia de cuerpo lúteo y folículos) al examen ginecológico por ultrasonografía. Comenzaron el período de servicio con un promedio de peso de 437 ± 54 kg y un estado corporal no menor a 5 (escala de 1 a 9) (Sanpedro y col., 2003). Se mantuvieron aisladas durante tres meses previo al comienzo del experimento y resultaron negativos a la detección de anticuerpos anti-BoHV-1 por la técnica de sero-neutralización (SN) *in vitro* y ELISA (Civtest, Laboratorio Hypra) durante al menos tres sangrados con intervalos no menores a 21 días.

Toros (n=3): raza Hereford, de 3 años de edad, provenientes del mismo establecimiento y sin antecedentes de haber 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 raspados consecutivos para la detección de *Campylobacter fetus* y *Trichomona foetus* según la metodología descrita por Repiso y col. (2005) con resultado negativo.

Células y virus: Se utilizó la línea celular de riñón bovino *Madin Darby bovine kidney* (MDBK) libre del Virus de Diarrea Viral Bovina. Los cultivos fueron mantenidos con Medio Eagle Modificado (MEM-Sigma), 50 mg/mL de Gentamicina y 10% de suero fetal bovino irradiado (GIBCO). La cepa de referencia de BoHV-1.1 Los Angeles (LA) procedente de American Type Culture Collection (ATCC) fue utilizada para la infección de los toros y para la evaluación de anticuerpos neutralizantes por SN *in vitro*. La titulación viral se realizó en microplacas de 96 pozos (NUNC) por el método de Dosis Infectante de Cultivo Celular 50 (DICC₅₀) y el título viral se calculó según el método estándar de Reed y Muench (1938) observando la presencia de efecto citopático (ECP) característico de BoHV-1.

Infección de toros: dos toros fueron infectados por vía ocular y nasal con una suspensión viral que contenía $10^{7.5}$ DICC₅₀/5 mL de BoHV-1.1 (cepa LA) según el protocolo descrito previamente por Guy y Potgieter (1985). Uno de ellos fue infectado 60 días antes del servicio y el otro al comienzo del servicio (toro con infección aguda). El tercero fue inoculado de la misma manera con sobrenadante de cultivo de células MDBK sin infectar (control negativo). El servicio comenzó con la entrada de los toros al rodeo (día 0) y permanecieron en el mismo 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:

Grupo control (GC): 28 vacas y toro seronegativo.

Grupo seropositivo (GS): 28 vacas y toro infectado 60 días antes del servicio (ingresa al servicio seropositivo a BoHV-1)

Grupo infección aguda (GIA): 27 vacas y toro infectado al comienzo del servicio.

Cada grupo fue mantenido en un potrero aislado de 33 hectáreas de campo natural (8 m de separación mínima entre grupos) con fuentes de agua no compartidas y suplementado con sales minerales *ad-libitum* (Cobalfosal, Deambrosi SA, Montevideo, Uruguay). Para el trabajo con los animales se compartieron las instalaciones, por lo tanto se tomaron medidas para prevenir la contaminación cruzada entre los grupos del ensayo. El grupo control pasaba primero por las instalaciones y luego se realizaba la desinfección con Cloruro de Benzalconio a la dilución recomendada, previo a la pasada de cada uno de los siguientes grupos. El GC y el GS comenzaron el ensayo al mismo tiempo y las vacas de los tres grupos fueron mantenidas hasta el día 180. Con la finalidad de disminuir el riesgo de transmisión cruzada del BoHV-1 entre los grupos del ensayo el GIA comenzó el servicio 30 días después.

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 (con 12 días de intervalo entre ambas) de un análogo sintético de la Prostaglandina F_{2α} (d-cloprostenol: Sincron D-L, Laboratorio Uruguay, Montevideo, Uruguay) en la dosis y vía recomendada por el fabricante. La administración de la segunda dosis del análogo sintético de la Prostaglandina F_{2α}, coincidió con el comienzo del servicio (día 0).

La respuesta a la sincronización fue evaluada durante el primer ciclo mediante observación directa de signos de celo a campo (2 veces/día) y con pintura en la zona dorsal en base de la cola. Se consideraron en estro aquellas vacas en las que se observaron signos de celo y/o cuando la pintura de la base de la cola estaba completamente borrada. Se calculó la frecuencia de signos de estro en cada uno de los grupos (vacas en celo/total de vacas*100).

La actividad de monta de los toros fue evaluada durante el primer ciclo mediante la observación a campo (2 veces/día) y con la colocación en los toros de un dispositivo que marca con pintura las hembras servidas (Chin-ball). Se consideraron como servidas aquellas vacas en las que se observó la monta a campo y/o presentaban pintura del Chin-ball en la zona del lomo y flancos. Se calculó la frecuencia de monta en cada uno de los grupos (vacas servidas/vacas ofrecidas *100).

Infección con *Herpesvirus bovine 1* sobre de preñez de vacas de cría

Diagnóstico de gestación: la evolución del porcentaje de preñez (PP) (PP = vacas gestadas/total de vacas*100) fue evaluada mediante ecografía a los días 35, 52 y 71. Las fechas fueron fijadas tomando en cuenta que transcurrieran al menos 30 días de la actividad cíclica observada en las vacas luego de la sincronización. A partir del cuarto mes el control de la gestación fue realizado por palpación rectal a los días 120 y 180 del ensayo.

Evolución del peso corporal: se pesaron todas las vacas los días - 30 (previos al servicio), 0, 30 y 60 post servicio. Se calculó la ganancia promedio tomando como valor inicial el peso individual de los 30 días previos al comienzo del experimento.

Toma de muestras y aislamiento viral: En el toro del grupo GS (infectado antes del comienzo del servicio) se tomaron muestras de hisopados nasal y ocular a los días 0, 7, 14, 21, 30 y 53 post-infección, para confirmar que se había infectado.

La excreción de BoHV-1 fue evaluada durante el servicio en los tres toros, por aislamiento viral en muestras de hisopados ocular, nasal, prepucial y líquido seminal tomadas a los días 0, 2, 4, 7, 14, 21, 25, 30, 38 y 49 post-comienzo del servicio. Las muestras de hisopos se transportaron refrigeradas 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.

El aislamiento viral se realizó en placas de 24 pozos utilizando el protocolo descrito en el Manual de Estándares para Test Diagnósticos y Vacunas de OIE (2004). Los aislamientos realizados fueron identificados por Inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando un anticuerpo policlonal anti-BoHV-1 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (VMRD-USA). En las muestras que no presentaron ECP se realizaron tres pasajes sobre células frescas antes de considerarlas negativas.

Serología: Para determinar anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1, se utilizó la técnica de SN *in vitro*, virus fijo-suero variable (House y Baker 1971). El título de anticuerpos SN se calculó por el método de punto final 50 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.

La detección de anticuerpos SN anti-BoHV-1 fue utilizada como indicador de infección durante el servicio. Las muestras del día 0 de todas las vacas del experimento fueron evaluadas además utilizando un *kit* comercial de ELISA para detectar anticuerpos totales anti-BoHV-1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Civtest, Laboratorio Hypra Uruguay). En los GC y GS se tomaron muestras por punción de la vena coccígea a los días 0, 14, 30, 49, 61 y 90 y en el GIA a los días 0, 14, 21, 30, 38, 52, 71 y 87 post-comienzo del servicio. Los tres toros fueron sangrados los días 0, 7, 9, 19, 26, 30 y 49 post-comienzo del servicio.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el Software Intercooled STATA 8.0 (Stata Corp. 2007). Las tablas de frecuencia de la actividad de monta de los toros, presencia de signos de celo en las vacas y el diagnóstico de gestación en cada uno de los grupos fueron analizadas por el test exacto de Fisher, estableciendo un nivel de significación de 5%. Cuando se encontraron diferencias significativas en las tablas de frecuencia se utilizó la corrección de Bonferroni ($\alpha = 0,0167$) para comparar los grupos por separado.

RESULTADOS

Al comienzo del servicio (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. La seroconversión específica (indicador de infección con BoHV-1) fue comprobada únicamente en las vacas del GIA. Fueron detectadas como seropositivas y por lo tanto infectadas con BoHV-1 el 11% (3/27) a los 14 días, el 41% (11/27) a los 21 días y el 70% (19/27) a 30 días. El título SN más bajo detectado fue de 2 y el más alto de 64. En el 30% (8/27) restante de las vacas no se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1. No se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 en las vacas y en el toro del GC y en las vacas del GS durante todo el ensayo.

En el toro del grupo GS (infectado 60 días antes del comienzo del servicio) se observó depresión y corrimiento ocular seroso por 48 horas post-infección. El BoHV-1 fue aislado e identificado del día 7 al día 21 post-infección a partir de muestras de hisopados oculares y nasales. Los anticuerpos SN anti-BoHV-1 fueron detectados los días 10, 21 y 30 post-infección, con títulos SN de 32, 64 y 32 respectivamente. El toro del grupo GIA (infectado al comienzo del servicio, día 0) presentó corrimiento ocular y nasal seroso por 3 días y se detectaron anticuerpos SN anti-BoHV-1 a partir del día 9 con un pico al día 20 post-infección, con títulos SN de 16 y 64 respectivamente. En la figura 1 se presenta la evolución del título SN durante el servicio en los toros del GS y GIA. El BoHV-1 fue aislado e identificado por Inmuno Fluorescencia Directa (IFD) únicamente en las muestras del toro que realizó el servicio en el GIA (infectado al comenzar el servicio). Los resultados del aislamiento viral se muestran en el cuadro 1. Las muestras de hisopos y líquido seminal tomadas de los toros del GC y GS durante el servicio para aislamiento viral resultaron negativas.

Al momento de la primera ecografía (día 35) la PP del GS (50%) y el GIA (26%) fue un 4% y 28% inferior a la encontrada en el GC (54%) respectivamente ($P=0,092$). En la segunda ecografía (día 52) se encontraron diferencias significativas en el PP entre

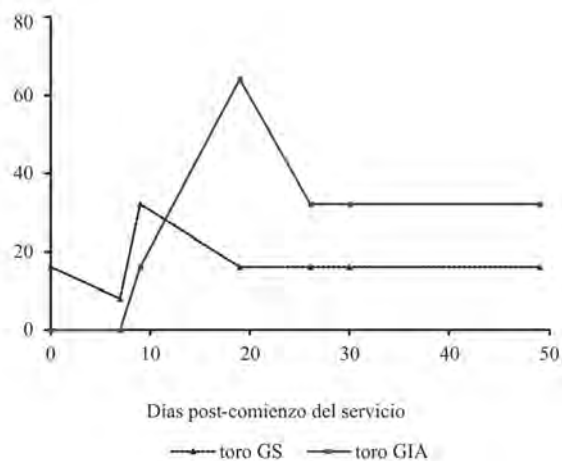


Figura 1. Evolución del título de anticuerpos seroneutralizantes (Título SN) anti-BoHV-1 en el toro del grupo seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA) durante el periodo de servicio.

Cuadro 1. Aislamiento en cultivos celulares de BoHV-1 a partir de muestras del toro infectado al comenzar el servicio (GIA).

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.

el GIA (33%) y el GC (86%) ($P < 0,0001$) y no se hallaron diferencias significativas entre el GS (79%) y el GC (86%) ($P = 0,729$; $\alpha = 0,0167$). Se observó por ecografía una reabsorción embrionaria en una vaca infectada con BoHV-1 (seropositiva) del GIA al día 52 del ensayo, no logrando concebir posteriormente. En la tercera ecografía (día 71) la PP del GIA aumentó a 78% y en el GS a 93% no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ($P = 0,313$). Luego de la tercera ecografía no se observaron cambios en la PP en el GC y el GIA. En el GS la disminución en la PP 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. En la figura 2 se observan los resultados del seguimiento de la gestación realizados en todos los grupos del experimento. Dentro del GIA pudieron definirse dos subgrupos de vacas: seropositivas (infectadas con BoHV-1, $n = 19$) y seronegativas (no infectadas, $n = 8$). Del 57% (12/21) de las vacas preñadas en el GIA, detectadas en la tercera ecografía, el 83% (10/12) de las mismas se infectaron con BoHV-1 (seropositivas). De las vacas que quedaron vacías en el GIA el 83% (5/6) se infectó con el virus (seroconvirtieron). Sin embargo, cuando se buscó asociar la ausencia de gestación con la infección por BoHV-1, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos definidos anteriormente. Los resultados de la evolución de la gestación en vacas infectadas y no infectadas con BoHV-1 se muestran en el cuadro 2.

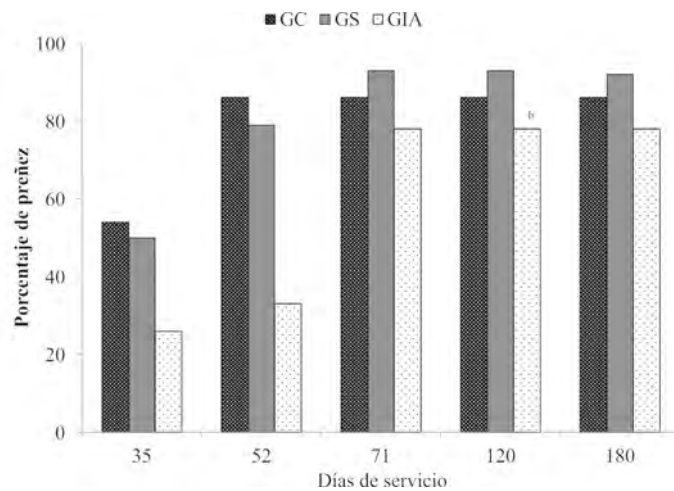


Figura 2. Evolución del porcentaje de Preñez en el grupo control (GC), seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA). a: diferencias no significativas ($P > 0,05$); b: diferencias significativas ($P < 0,05$).

Cuadro 2. Evolución acumulada del porcentaje de Preñez (PP) en las vacas del grupo infectado agudo (GIA) según el estado de infección con BoHV-1.

	Ecografía (día 35) ¹		Ecografía (día 52) ²		Ecografía (día 71) ³	
	Seropositivas	Negativas	Seropositivas	Negativas	Seropositivas	Negativas
Gestadas	3	4	4	5	14	7
Vacías	16	4	15	3	5	1
PP (%)	16	50	21	63	74	88

¹P = 0,145; ²P = 0,072; ³P = 0,633.

Infección con *Herpesvirus bovinus 1* sobre de preñez de vacas de cría

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de monta de los toros ya que el 89%, 70% y 71% de las vacas en los GC, GS y GIA respectivamente fueron detectadas como servidas ($P=0,171$). Se detectaron signos de celo en el 100%, 89% y 96% de las vacas del GC, GS y GIA respectivamente, las diferencias observadas no fueron significativas ($P=0,121$). Todas las vacas aumentaron de peso desde el inicio y durante todo el servicio y la ganancia promedio observada fue de 354 ± 153 g/día.

DISCUSIÓN

El 70% (19/27) de las vacas del GIA fueron detectadas como seropositivas desde el día 14 al día 30 de comenzado el servicio, lo que demuestra que la infección con BoHV-1 se produjo en las primeras semanas del servicio, ya que como fue descrito previamente por Guy y Potgieter (1985) la respuesta humoral puede detectarse por SN *in vitro* entre los 7 a 10 días post-infección. Hage y col. (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 encuentran en un sistema productivo intensivo, con un mayor contacto y no a campo como en el presente ensayo.

Las posibles vías de infección en las vacas del GIA pueden haber sido tanto la respiratoria como la genital, ya que el BoHV-1 fue aislado e identificado en el toro a partir de hisopados oculares, nasales, prepuciales y líquido seminal del día 2 al 30 post-infección. La infección se realizó 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 y 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. Wentink y col. (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 post-infección. En nuestro ensayo, no se tomaron muestras para realizar aislamiento viral en las vacas que fueron infectadas, pero es probable, que estas también hayan transmitido el virus, favoreciendo la diseminación de la infección dentro del GIA.

En el toro infectado 60 días antes del comienzo del servicio, se demostró seroconversión específica y se aisló BoHV-1 a partir de hisopados nasales y oculares. Por lo tanto, se puede afirmar que la infección fue efectiva y probablemente también se encontraba latentemente infectado.

Durante todo el experimento el PP 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. Debido a la sincronización realizada, las vacas observadas en celo entre el día 2 a 4 (patrón de respuesta en la sincronización con doble dosis de

análogo sintético de ProstaglandinaF2 α) y que no quedaron gestadas en el GIA (20/27), repitieron el celo 19 a 21 días después (Dziuk y Bellows 1983). Por lo tanto, los dos primeros ciclos estrales en las vacas del GIA se dieron al mismo tiempo que la circulación de BoHV-1 dentro del grupo. Solo dos 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 y Van Der Maaten, 1985; Miller y Van Der Maaten, 1986; Miller y Van Der Maaten, 1987).

Los resultados obtenidos difieren de los descritos en un trabajo similar realizado por Parsonson y Snowdon (1975), quienes no encontraron pérdidas reproductivas luego del servicio por monta natural a campo de 9 vacas con un toro excretando BoHV-1. Sin embargo, se deben marcar diferencias con el trabajo de estos autores. El número de vacas utilizadas en nuestro ensayo fue notoriamente superior ($n=27$). Por otro lado, la cepa de BoHV-1 empleada para la infección en el trabajo de Parsonson y Snowdon, (1975) posiblemente fuera del subtipo 2b, ya que fue un aislamiento de un toro con Balanopostitis infecciosa como único signo clínico. El subtipo 2b ha sido asociado con Balanopostitis y Vulvovaginitis, pero no con pérdidas reproductivas. En nuestro ensayo, se utilizó la cepa de referencia Los Angeles (BoHV-1.1) que pertenece al subtipo 1.1 y está asociada a cuadros respiratorios e infertilidad en bovinos (Miller y col., 1991).

A los 71 días el PP 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 y col., 1991; Del Fava, 2001). Probablemente las vacas que se infectaron en las primeras tres semanas del servicio desarrollaron una respuesta inmune, controlaron la infección y lograron concebir. Esta afirmación está basada en que el 83% de las vacas que quedaron gestadas al final del servicio seroconvirtieron y por lo tanto se encontraban infectadas con BoHV-1.

Los resultados obtenidos muestran que durante las dos primeras ecografías la mayoría de las vacas infectadas con BoHV-1 (seropositivas) permanecieron vacías. Si bien no fue posible establecer una asociación estadística entre vacas infectadas y la ausencia de gestación al momento de la segunda ecografía, se registró una tendencia ($P=0,072$) a que los resultados obtenidos no fueran debidos al azar. Es probable, que si las diferencias encontradas se mantuvieran y el número de vacas del ensayo hubiera sido mayor esta asociación podría haber sido demostrada. Se han descrito alteraciones en la calidad seminal post-infección con BoHV-1 que pueden haber influenciado los resultados del PP (Deas y Johnston, 1973). En ese 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, otros autores no encontraron alteraciones seminales post-infección 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 y col., 1971; Van Oirshot y col., 1993; Deka y col., 2005).

El título SN del toro del GS, no varió en más de dos diluciones durante el servicio y BoHV-1 no fue aislado de hisopados o líquido seminal. Por lo tanto, el trabajo de monta durante el servicio, no fue suficiente estrés para que un toro seropositivo y latentemente infectado reactivara el virus y se estimulara la respuesta inmune. El PP del GS no presentó diferencias con el GC. Esto último, sumado a que las vacas del GS permanecieron seronegativas, indicaría que el virus no se reactivó ni re-excretó en este toro y por lo tanto no se transmitió a las vacas durante el servicio. Este resultado está de acuerdo con lo reportado previamente Parsonson y 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 y col., 2005). En el presente experimento no fue comprobada la transmisión del virus durante el servicio a través de la monta natural utilizando un toro seropositivo y probablemente latentemente infectado con BoHV-1. Los anticuerpos SN presentes al momento del servicio pueden haber jugado un rol importante en el control de la reactivación y la excreción del virus, como fue reportado por Babiuk y col., (1996). Sin embargo, se ha comunicado la excreción intermitente de BoHV-1 en el semen de toros seropositivos latentemente infectados (Van Oirshot y col., 1995) y la introducción de la enfermedad a rodeos libres por el ingreso de bovinos latentemente infectados (Hage y col., 1996). Si bien, nuestros resultados no demostraron la transmisión de BoHV-1 durante el servicio a campo, está claro que los animales latentemente infectados son un riesgo en la transmisión del virus.

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 y Bellows (1983) como limitantes en la TP. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que no se observaron diferencias significativas en la actividad cíclica de las vacas ($P=0,121$) y en la actividad de monta de los toros ($P=0,171$) durante la primera etapa del servicio. Las condiciones en que fueron mantenidos los bovinos durante el servicio fueron similares, ya que los tres grupos fueron alojados en potreros linderos, accedieron a los mismos con el mismo tiempo de descanso y todas las vacas ganaron peso durante el servicio. Basados en estos resultados, se podría afirmar que el PP no fue influenciado por los factores antes mencionados.

Las medidas de control utilizadas fueron eficaces para prevenir la transmisión del virus entre los grupos ya que en los bovinos del GC, que se ubicó en un potrero central del establecimiento que lindaba con los potreros del GS y el GIA, no se detectó seroconversión. Mars y col. (2000) establecieron que una dis-

tancia 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.

Al momento de comenzar el ensayo se asumió que los bovinos 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 y col., 1971; Deas y Johnston, 1973; Alonzo y col., 2002). Sin embargo, esto sería difícil de implementar ya que se debería inmunodeprimir a todos los bovinos previo al ensayo y/o monitorear por largos periodos con técnicas moleculares (PCR) para determinar que no son portadores del virus (Grom y col., 2006). Basados en estos antecedentes y con la metodología empleada en el presente trabajo, no se puede rechazar la posibilidad de que alguno de los bovinos utilizados estuviera latentemente infectado con BoHV-1 previo al ensayo. Sin embargo, podemos afirmar que las vacas que se hicieron seropositivas durante el servicio, tuvieron contacto con BoHV-1 en este periodo y probablemente en estas vacas el virus estableció latencia en tejidos nerviosos.

CONCLUSIONES

El ingreso a un rodeo de cría de un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1, provocó la transmisión del virus de forma rápida y la mayoría de las vacas expuestas se infectaron.

No se detectó la transmisión del virus, en vacas de cría servidas con un toro seropositivo a BoHV-1 infectado dos meses antes de comenzar el servicio.

En condiciones de campo similares a las utilizadas en nuestro sistema de cría, el PP fue afectado únicamente cuando se utilizó para el servicio un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.1.

Agradecimientos

Al Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria – UdeLaR, ya que el presente trabajo forma parte de la tesis de Maestría en Salud Animal del Dr. Pablo Alonzo, «Herpesvirus Bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección».

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay quien aportó la financiación para este trabajo.

Al Ing. Agr. Juan Luis Algorta de Deambrosi S.A, por la donación de las bateas para sales minerales.

Referencias bibliográficas

1. 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.
2. Babiuk L, Van Drunen L, Tikoo S. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
3. 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.
4. Castro RSL, Abreu JJ, Coelho S G, 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.
5. Deas DW y Johnston WS. (1973). The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Vet Rec* 92:636-639.
6. Del Fava C. (2001). Índices reproductivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e nao infectados pelo herpesvirus bovinus tipo 1 (HVB-1). Tesis de doctorado en Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Pablo, Brasil.
7. 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.
8. 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.
9. Dziuk PJ y Bellows RA. (1983). Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. *J. Anim. Sci.* (Suppl. 2): 355-379.
10. Engels M, Ackermann M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 53:3-15.
11. 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.
12. 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.
13. Guy JS, Potgieter LND. (1985). 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.
14. 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.
15. House JA, Baker JA. (1971). Bovine herpesvirus IBR/IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet* 61:320-335.
16. Huck RA, Millar P G, 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.
17. Manual de Standards para Test Diagnósticos y Vacunas (2004). Elaborado por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), Cuarta edición, capítulo 2.3.5:1381-1439.
18. Mars MH, de Jong MCM, van Maanen C, Hage JJ, Van Oirschot JT. (2000). Airbone transmission of bovine herpesvirus 1 infection in calves under field conditions. *Vet Microbiol* 76:1-13.
19. Miller JM y 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Reed LV, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Stata Corp. (2007). Stata statistical software: release 10, College station TX: Stata Corp. LP.
29. Van Oirschot JT. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 17:29-33.

Alonzo, P., Puentes, R. *et al.*

30. 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.
31. Wentink GH, Van Oirschot JT, Verhoeff J. (1993). Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV-1): a review. *Vet Q* 15:30-33.