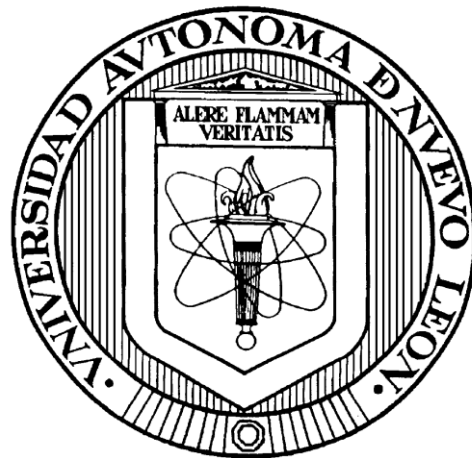


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Detección molecular y aislamiento del Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1)
en sementales de hatos bovinos del noreste de México.**

Por

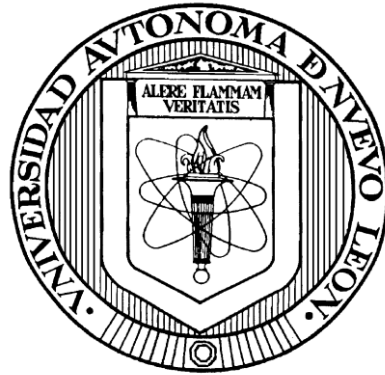
M.V.Z. ANÍBAL GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
con Especialidad en Salud Animal**

Febrero, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Detección molecular y aislamiento del Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1) en
sementales de hatos bovinos del noreste de México.**

REVISADA POR:

Dr. Ramiro Avalos Ramírez
Director de Tesis

MVZ.MCV. David Domínguez Díaz
Co-Director de Tesis

Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Co-Director de Tesis

Dr. Rubén Cervantes Vega
Co-Director de Tesis

Dr. José Antonio Salinas Meléndez
Co-Director de Tesis

Dr. Gustavo Hernández Vidal
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

Dedicada especialmente con todo mi amor y cariño a mi Madre, la Sra. María Magdalena Rodríguez de González, gracias por ser una excelente Madre y por todo el apoyo que siempre me has dado sobre todo cuando cursaba el Posgrado.

A mis Abuelos Maternos, la Sra. Aurora Stabolito de Rodríguez y al Sr. Guillermo Rodríguez Martínez. A mi Amigo, M.C.P. Francisco Arturo de León de León quienes fallecieron durante el curso de mi Posgrado.

Agradecimientos

Gracias Dios, por permitirme realizar un logro profesional más en mi vida.

A mi Madre, María Magdalena Rodríguez de González, a mi Padre Profr. Amador González Hinojosa, a mis Hermanos M.V.Z. Amador González III Rodríguez y Arq. Germán González Rodríguez, a mis Tías L.C.B. Medea E. González Hinojosa y Profra. María Aurora Rodríguez Stabolito, a mis Primos Lic. Emilio A. Guerra González y C.D. Rolando J. Saldaña González.

A mi Primo, I.M.E. M.I. Mario A. Saldaña González, por toda su ayuda y por ser una persona que influyó a decidirme en ingresar al Posgrado.

A mi Tío C.D. Mario A. Saldaña García, por permitir ser mi aval en el crédito que obtuve del Instituto de Crédito Educativo del Estado de Tamaulipas, el cual me ayudó financiando parte de mi estudio de Posgrado.

Un agradecimiento especial a mi Asesor Principal de Tesis el Dr. Ramiro Avalos Ramírez y a mis Co-Asesores la Dra. Sibilina Cedillo Rosales y al M.V.Z. M.C. David Domínguez Díaz, por haberme permitido ser su Tesista, por sus enseñanzas y por despertar en mí el interés en una de las más hermosas ramas de la Medicina Veterinaria como lo es la Virología.

Al M.V.Z. Gabriel De León Martínez por su gran ayuda y consejos en el área de Laboratorio.

A mis Co-Asesores de Tesis el Dr. Rubén Cervantes Vega, Dr. Antonio Salinas Meléndez y el Dr. Gustavo Hernández Vidal.

Al M.V.Z. Epifanio Callejas Martínez, M.V.Z. Eduardo Villarreal Muños, M.V.Z. J. Nicolás de Tellitu González y al Lic. Valentín Barrera González, por su ayuda y recomendaciones en el campo.

A todos los Maestros de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que colaboraron a la formación de mi educación en el Posgrado.

Al personal del Área de Aislamiento Viral y de Biología Molecular del Laboratorio Central Regional de Monterrey (LCRM) del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León (CFPPNL).

Y a todas aquellas personas, que sin intención de omitir sus nombres me apoyaron de alguna u otra forma en la elaboración de mi Tesis.

Índice

	Página
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice	III
Índice de Figuras	VI
Índice de Cuadros	VII
Lista de abreviaturas y simbología	VIII
Resumen	X
1. Introducción	1
1.1 Justificación	3
1.2 Hipótesis	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 General	4
1.3.2 Específicos	4
1.4 Metas	5
2. Literatura Revisada	6
2.1 Historia del BoHV-1	6
2.2 BoHV-1 en México	10
2.2.1 BoHV-1 en Nuevo León	11
2.2.2 BoHV-1 en Tamaulipas	11
2.3 Mecanismos de propagación del BoHV-1	12
2.4 Taxonomía y Biología Molecular del BoHV-1	15
2.4.1 Taxonomía	15
2.4.2 Biología Molecular	16
2.4.2.1 Replicación Viral	20
2.5 Modelos de Infección del BoHV-1	21
2.5.1 Infección aguda	21

2.5.2 Infección latente	25
2.6. Diagnóstico	27
3 Materiales y Métodos	31
3.1 Lugar de realización de la Investigación	31
3.2 Características de los hatos y bioseguridad	31
3.3 Muestras	34
3.3.1 Número de muestras y procedencia	34
3.3.2 Colección y manejo de muestras	34
3.3.2.1 Colección mediante el uso del electroeyaculador	34
3.3.2.2 Manejo de las muestras	36
3.4 Cultivo de células MDBK	36
3.4.1 Control de calidad del suero fetal bovino (SFB)	36
3.4.2 Línea celular y su cultivo	37
3.4.3 Disgregación celular	37
3.4.4 Conteo celular	38
3.4.4.1 Cálculo del número de células	40
3.5 Cepa control del BoHV-1	40
3.6 Aislamiento viral en cultivo de células	40
3.7 Titulación viral de la cepa control y de los aislados virales de campo	41
3.8. Ensayo de seroneutralización viral	42
3.9 Producción de antisueros anti-BoHV-1 en caprinos	44
3.10 Inmunofluorescencia indirecta	46
3.11 Detección molecular del BoHV-1	47
3.11.1 Extracción de ADN de semen	47
3.11.2 Extracción de ADN de sobrenadante de cultivos de células	48
3.11.3 Iniciadores	49
3.11.4 PCR de gradientes	49
3.11.5 Programa en el termociclador	50

3.11.6 Protocolo del PCR	50
3.11.7 Electroforesis y visualización de amplicones	51
4 Resultados	52
4.1 Hatos, raza, edad y procedencia de los positivos al BoHV-1	52
4.2 Aislamiento viral	53
4.3 Identificación serológica mediante seroneutralización	57
4.4 Identificación serológica mediante Inmunofluorescencia Indirecta	58
4.5 Detección y diferenciación molecular del BoHV-1 mediante PCR	59
5 Discusión	61
6 Bibliografía	66

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Organización del genoma de los Alphaherpesvirus	18
2	Morfología de un virión de Herpesvirus	19
3	Signos clínicos en animales infectados por IBR	23
4	Forma genital de la infección por BoHV-1	24
5	Obtención de fluido seminal mediante electroeyaculación de un semental bovino	35
6	Conteo celular en cámara de Fuchs-Rosenthal	39
7	Células MDBK control sin inocular al 100% de confluencia	55
8	Monocapa de células MDBK inoculadas con plasma seminal de bovino sin diluir, efecto a las 8 hrs post-inoculación	55
9	Efecto citopático (24-72 hrs) producido por la cepa de referencia Cooper del BoHV-1 en la monocapa de células MDBK	56
10	Efecto citopático producido por una de las cepas aisladas	56
11	Inmunofluorescencia indirecta para la identificación serológica del BoHV-1.	58
12	Amplificación de un fragmento de 97 pb del gen de la glucoproteína B del BoHV-1	60
13	Amplificación de un fragmento del gen de la glucoproteína C del BoHV-1	60

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Concentración viral, dosis y ruta de inoculación en caprinos para la obtención de suero policlonal anti-BoHV-1	45
2	Ubicación de los hatos y proporción de sementales infectados	52
3	Relación entre la edad y raza de los sementales positivos al BoHV-1 con la cantidad de pasajes en cultivo de células	54
4	Relación antigénica entre la cepa control del BoHV-1 y las cepas aisladas	57

Lista de abreviaturas y simbología

ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ADN ó DNA	Acido desoxirribonucleico
α -TIF	Factor transactivador de los genes alfa
BoHV-1	Herpesvirus Bovino tipo 1
°C	Grados Centigrados
ECP	Efecto Citopático
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a Enzima
EUA	Estados Unidos de América
g	Fuerza centrífuga relativa
HSV	Herpesvirus simple
IBR	Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
IPB	Balanopostitis Pustular Infecciosa
IPV	Vulvovaginitis pustular infecciosa
IR	Terminaciones internas invertidas
kbp	Pares de kilobases
kDa	Kilodaltons
MDBK	Línea celular Madin-Darby de riñón bovino
MDV	Enfermedad de Marek's
mm	Milímetros
μ m	Micrones ó micras
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
%	Porcentaje
TCID ₅₀ %	Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50 porciento
TR	Repeticiones terminales
U _L	Región única larga
U _S	Segmento único
VP	Proteína del virión
VZV	Virus varicela-zoster

El presente trabajo fue financiado parcialmente con fondos de los siguientes proyectos:

.- CONACYT y el Gobierno del Estado de Nuevo León a través de Fondos Mixtos (FOMIX). Proyecto: “Prevalencia serológica y análisis de riesgo de IBR, DVB, Leptospirosis y Neosporosis en hatos de N.L.” Clave: NL2004-C05-107.

.- Universidad Autónoma de Nuevo León. A través de PAICyT 2009 apoyo para los Cuerpos académicos. Proyecto: “Implementación y adecuación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, marcadores genéticos y pruebas de paternidad en animales domésticos” Clave: GCT013-09

Resumen

Aníbal González Rodríguez

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Cuerpo Académico de Epidemiología Veterinaria y Departamento de Virología Veterinaria

Título del Estudio: Detección molecular y aislamiento del Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1) en sementales de hatos bovinos del noreste de México.

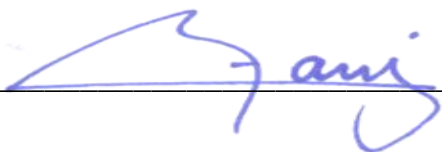
Área de Estudio: Virología y Epidemiología.

Objetivo y Metodología del Estudio: Demostrar la presencia del Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) en fluido seminal de sementales bovinos clínicamente sanos del noreste de México. De 15 hatos se recolectaron 65 muestras de fluido seminal, obtenidas mediante electroeyaculación, de igual número de toros usados como sementales. Las muestras fueron analizadas mediante PCR e inoculadas en células MDBK usando procedimientos convencionales. Para detectar al BoHV-1 en plasma seminal y/o en sobrenadante de células MDBK infectadas, de forma independiente, se usaron 2 pares de iniciadores específicos. Los iniciadores amplifican fragmentos de los genes de las glucoproteínas (GP's) B (97pb) y C (122bp) del virus. La identificación serológica de los aislados fue llevada a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y seroneutralización (SNT) con el uso de un suero policlonal caprino anti-BoHV, producido contra la cepa Cooper de referencia.

Resultados: Todas las muestras resultaron negativas a la detección del BoHV-1 mediante PCR directamente aplicado al ADN obtenido del fluido seminal. Al aislamiento en MDBK, 2 de los 15 (13.3%) hatos analizados fueron positivos. Esto correspondió a que, del total de sementales analizados, el 6.2% resultó positivo al aislamiento del BoHV-1 (4/65). Los animales infectados procedieron de dos hatos de la raza charolais y beefmaster. Todas muestras positivas al aislamiento necesitaron cuando menos 2 pasajes ciegos antes de mostrar efecto citopático (ECP). El ECP de los aislados fue similar a la cepa control, pero a la IFA se observó menor intensidad en 3 de los aislados con respecto a la cepa control. Esto también fue reflejado en los títulos de SNT, la cepa Cooper control con su suero homólogo mostró un título mayor (1:81) que 3 de los aislados (1,1:9; 3 y 4, 1:27). Los sobrenadantes de MDBK de todas las muestras que mostraron ECP amplificaron, de forma independiente, fragmentos específicos de los genes B y C del BoHV-1.

Contribuciones y conclusiones: Se aisló al BoHV-1 en toros clínicamente sanos usados como sementales. La detección molecular del BoHV-1 mediante PCR falló, con la metodología empleada, a partir de plasma seminal. Fue necesario realizar cuando menos 2 pasajes ciegos en las muestras positivas en cultivo de células para evidenciar la presencia del virus mediante el ECP e IFA. A través de SNT, se encontraron indicios de variaciones antigénicas entre las cepas aisladas del BoHV-1 con respecto a la cepa control. Los datos confirman el carácter enzootico del BoHV-1 en bovinos de la región noreste por lo que es necesario reforzar los protocolos de diagnóstico y control contra este virus.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS:



X

1 Introducción

El herpesvirus bovino 1 (del inglés, BoHV-1) es uno de los patógenos de mayor relevancia e impacto económico en la industria bovina a nivel mundial. Se estima que la infección por BoHV-1 cuesta al sector ganadero, ya sea por enfermedad o restricciones comerciales, al menos 500 millones de dólares anuales tan solo en los Estados Unidos de América (Muylkens, B., et al., 2007; Jones, C., 2003). Debido a las significantes pérdidas asociadas a este virus, en distintos países y regiones del mundo se han establecido programas de control y erradicación del BoHV-1 a través de revisiones estrictas en la comercialización de ganado, semen y embriones y en la detección y sacrificio del animal infectado (Alegre, M., et al., 2001; Noordegraaf, A.V., et al., 2000).

El BoHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* del género *Varicellovirus* (Rocha, M.A., et al., 1998). Este virus es el agente causal de diversos síndromes entre los que se incluyen: La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB ó IBR), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VVPI ó IPV) y Balanopostitis Pustular Infecciosa (BPI ó IPB). Además, también participa como agente causal de conjuntivitis, endometritis, infertilidad, abortos, infecciones multisistémicas fatales en becerros recién nacidos y muertes (Alegre, M., et al., 2001; Deka, D., et al., 2005). La infección del BoHV-1 en el ganado conduce al establecimiento del virus de forma latente principalmente en los nervios ganglionares trigéminos y del sacro (Vogel, F.S.F., et al., 2004). El virus en estado latente puede reactivarse y en consecuencia excretarse, con el riesgo de infectar a los animales sanos del hato (Kaashoek, M.J., et al., 1996 a y b), los periodos de reactivación del virus ha sido demostrado que está

asociado a condiciones de estrés, como en el momento de la transportación de los animales de un lugar a otro, el parto y tratamientos de corticosteroides (Deka, D., et al., 2005; Schynts, F., et al., 2003). La mayoría de las infecciones por BoHV-1 ocurren de manera subclínica, lo que permite al virus propagarse entre la población bovina (Vogel, F.S.F., et al., 2004). El virus es muy contagioso y es transmitido principalmente mediante secreciones respiratorias, oculares y genitales en contacto directo estrecho entre los animales. El BoHV-1 es considerado el patógeno viral más común encontrado en semen de bovinos (Deka, D., et al., 2005). La infección puede propagarse a través de semen fresco o congelado siendo esto algo muy importante debido a la sobrevivencia del virus a temperaturas por debajo de los -65°C (Nuotio, L., et al., 2007; Wiedmann, M., et al., 1993). Dado que el virus es encontrado frecuentemente en el semen, éste puede transmitirse extensamente durante la monta natural ó inseminación artificial (Xia, J.Q., et al., 1995). Los toros utilizados para monta natural o inseminación artificial deben ser analizados periódicamente para la detección de virus mediante análisis de laboratorio (Lata, J., 2006).

El aislamiento viral en cultivos celulares es reconocida como la prueba de oro para la detección del virus en el semen (OIE., 2008). La evidencia del efecto citopático debe acompañarse con pruebas serológicas y moleculares para confirmar la presencia del BoHV-1. En la actualidad, el uso de herramientas del diagnóstico molecular ha permitido reconocer la presencia del virus de manera rápida y sensible en distintos tipos de muestras. No obstante, y dado el mecanismo de persistencia del virus, es factible que animales infectados puedan no ser reconocidos por estos sistemas de diagnóstico. En el presente estudio, el BoHV-1 se aisló y caracterizó a

partir semen de toros bovinos clínicamente sanos usados como sementales en distintos hatos del noreste de México.

1.1 Justificación

Las pérdidas económicas provocadas por el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) y el mecanismo de persistencia entre la población bovina representan retos importantes para la detección y control de la infección provocada por este virus. En la región noreste de México el BoHV-1 mantiene elevados índices de seroprevalencia a nivel de hato. Dado el mecanismo de latencia de este virus es factible que sementales bovinos independientemente de su estatus serológico secreten al virus de manera intermitente e irregular. La detección mediante aislamiento y métodos moleculares, permitirá reconocer a los animales infectados lo que permitirá controlar la infección y evitar su diseminación en la población bovina. Con ello se pretende aminorar las pérdidas económicas inducidas por la reactivación del virus en los bovinos.

1.2 Hipótesis

Dados los mecanismos de persistencia y patogenicidad y a la prevalencia y distribución del Herpesvirus Bovino-1 (BoHV-1) en la zona noreste, es posible que el virus se encuentre en fluidos seminales de toros clínicamente sanos usados como sementales en hatos bovinos del noreste de México. La presencia del BoHV-1 en

estos fluidos se puede evidenciar mediante aislamiento en cultivo de células y métodos moleculares.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Demostrar la presencia del Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) en sementales bovinos clínicamente sanos del noreste de México mediante el aislamiento en cultivo de células y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.3.2 Específicos

- Aislar y caracterizar genética y antigénicamente cepas del BoHV-1 en semen de bovinos de hatos del Noreste de México.
- Adaptar un sistema sensible y específico para la detección del BoHV-1 en semen de bovinos a través del aislamiento en cultivo de células y posterior confirmación serológica y molecular.
- Aplicar el procedimiento de PCR para el diagnóstico de la infección por BoHV-1.
- Estimar la frecuencia de sementales clínicamente sanos infectados con el BoHV-1.

1.4 Metas

- Disponer de un sistema de diagnóstico sensible y específico para la infección provocada por el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1).
- Contribuir al estudio de la epidemiología del BoHV-1 de este virus en el Noreste de México.
- Favorecer al sistema pecuario mediante el oportuno reconocimiento de unas de las causas más importantes y frecuentes en problemas reproductivos y respiratorios en bovinos.
- Iniciar un banco de cepas y datos que coadyuven en el establecimiento de medidas preventivas y de control para la infección y enfermedades provocadas por el BoHV-1.

2 Literatura Revisada

2.1 Historia del BoHV-1

A continuación se enlistan algunos acontecimientos importantes desde las primeras descripciones de la enfermedad(es) atribuidas al BoHV-1 hasta los datos actuales de relevancia.

- Principios del siglo 19: Büchner y Trommsdorf describieron en Alemania el “Bläschenauslag” (Coital vesicular exantema, exantema vesicular coital) (citado por Muylkens B., et al., 2007).
- 1928: Reisinger y Reimann, investigadores alemanes, demuestran la etiología viral de esta enfermedad venérea, mediante la transmisión de un “agente filtrable” (Reisinger, L; Reimann, H., 1928).
- Hasta principios de los años 50: las manifestaciones clínicas del BoHV-1 estuvieron circunscritas en órganos genitales (Vulvovaginitis Pustular Infecciosa [VVPI] en vacas y Balanopostitis Pustular Infecciosa, [BPPI] en toros) de bovinos en Europa (citado por Muylkens B., et al., 2007).
- 1941: Investigadores detectaron anticuerpos específicos de IBR en suero de ganado en New York y New Jersey.
- 1949: En Colorado EUA, se reconoció a una infección del tracto respiratorio superior como una enfermedad respiratoria contagiosa nueva, aguda, que afecta al ganado bovino, con tasas de morbilidad del 10% al 30% y tasas de letalidad del 2% al 10%. Esta condición fue nombrada “red nose” (nariz roja) en base de uno de sus destacados signos clínicos, pero posteriormente llegó a conocerse como rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Casi

simultáneamente se describió una enfermedad similar en vacas lecheras en California (Miller, N.J. 1955).

- 1954: Investigadores publican el primer informe de IBR, describiendo al parecer una nueva enfermedad respiratoria de las vías superiores que ocurrió en California en 1953, apareciendo de forma repentina y caracterizada por fiebre alta y agalaxia además de signos respiratorios. La causa fue indeterminada en ese momento, pero la enfermedad puede transmitirse con tejidos y exudados de casos naturales. La enfermedad se estaba presentando en el ganado bovino lechero y de carne de todas las edades, tanto en el ganado de engorda así como en el de pastoreo. Esto era conocido como “red nose”, “dust pneumonia”. En el mismo año, el nombre aceptado para la enfermedad se convirtió en la rinitis infecciosa bovina.
- 1955: Se reporta la ocurrencia de abortos al mismo tiempo que ocurre la infección respiratoria por BoHV-1 en EUA (Jensen, R., et al., 1955). Pero hasta 1964 se describe y reproduce el aborto por diversos investigadores (Chow, T.L., et al., 1964; Crane, C.S., et al., 1964; Kennedy, P.C., et al., 1964; McKercher, D.G; Wada, E.M., 1964).
- 1956: Investigadores logran aislar por primera vez el agente etiológico de IBR y lo clasifican posteriormente como un herpesvirus y nombrado como BoHV-1, aislado de bovinos enfermos de California y Colorado. Posteriormente

estudios revelaron que el BoHV-1 era un factor de predisposición por neumonía de fiebre de embarque en ganado bovino.

- 1958: Investigadores refirieron a las manifestaciones de la infección genital como vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) para reemplazar los términos usados previamente (enfermedad venérea vesicular, vaginitis vesicular, exantema vesicular coital, bläschenausschlag, etc). Investigadores afirman que ningún caso en EUA se ha reconocido de la enfermedad antes de 1949. En Ontario Canadá, se reporta el primer aislamiento de IBR obtenido de un brote de IPV (Curtis, R.A., et al., 1966)
- 1961: Investigadores sugieren que el virus de IBR pertenece al grupo de herpesvirus. Intentaron establecer el lugar de origen de la forma respiratoria de IBR que se observa en los EUA, comentando que aunque no se conozca el momento y el lugar de origen de la enfermedad puede que nunca se vaya a saber con exactitud, pero piensan que es posible que la enfermedad se originó en el oeste de los EUA haya sido como una nueva entidad.
- 1962: La forma encefálica de la IBR fue descrita por investigadores australianos y aíslan por primera vez al BoHV-1 a partir de becerros con encefalitis (French, E.L., 1962), al año siguiente en Ontario y EUA se vuelve a aislar de tejido nervioso en becerros con meningoencefalitis (Barenfus, M., et al., 1963). Estos virus corresponden a lo que hoy se conoce como BoHV-5 (Chung, C.S., et al., 1994; Delhon, G., et al., 2003).

- Investigadores han encontrado una posible explicación de hechos contradictorios sugiriendo que el virus fue probablemente una de las causas de "Blaschenausschlag" (vulvovaginitis pustulosa infecciosa, IPV), una enfermedad venérea leve que había sido descrita en la literatura alemana desde aproximadamente mediados del siglo XIX. Este virus pudo haber llegado a América del Norte de Alemania en ganado subclínicamente infectado en algún momento antes de 1930 cuando sucedió un embargo de bovinos que entró a los EUA de Europa, las pruebas serológicas sugirieron que la entrada se produjo en los estados del noreste de los EUA. El virus probablemente se mantuvo como una enfermedad venérea leve durante muchos años hasta que nuevos sistemas de gestión de corrales de engorde en el oeste de EUA aumentó su virulencia y dieron lugar a la forma respiratoria de la enfermedad.
- 1976: Se registra el primer brote de cuadro respiratorio de IBR en Alemania, este hecho sugiere que una modificación similar del virus ocurrió en ambos continentes pero en momentos diferentes.
- 1977: Investigadores declaran que el término de BoHV-1 se refiere a todas las cepas aisladas del virus que son serológicamente relacionadas con el virus IBR/IPV, y que es un típico miembro de la familia *Herpesviridae*.

Tras la aparición de IBR en los EUA, fue diagnosticada en muchos países y reportándose a ser de distribución mundial.

- A finales de 1970's: ocurrieron brotes mucho más graves, tomando lugar en la ganadería intensiva, tal vez en forma paralela al supuesto modelo evolutivo en los EUA.
- 1991-1997: Se realiza la secuenciación del genoma de BoHV-1 dentro del proyecto "The BoHV-1 Genome Project", enmarcado en un programa de cooperación internacional entre diferentes laboratorios (Yates, W.D.G., 1982; Serra H.X., 2004; Ellis J., et al., 2005; Lata J., 2006; Muylkens B., et al., 2007).

2.2 BoHV-1 en México

La enfermedad de nombre IBR, provocada por el BoHV-1, es una enfermedad enzoótica de notificación obligatoria en México, y pertenece al grupo B del Código Zoonosario Internacional. El BoHV-1 en México, está incluido dentro de las enfermedades infecciosas más importantes en los hatos lecheros, en la mayoría siendo de manera subclínica en la que está presente, con abortos y subsecuentemente pérdida de la cría y lactancia siendo estas como principales características, y a la vez se reflejan afectados los parámetros reproductivos y productivos y a su vez se nota el incremento de pérdidas económicas. En un estudio, donde muestras enviadas al Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, entre Enero de 1992 a Febrero de 1996, se obtuvo una frecuencia de positivos de 56.53% en 18 estados de la Republica Mexicana (Bracho, C.A. et al., 2006).

2.2.1 BoHV-1 en Nuevo León

De acuerdo a un proyecto que se realizo en el año 2002, se analizaron en total 485 sueros de bovinos de 75 ranchos para IBR, ubicados en 20 Municipios del estado de Nuevo León, muestreo realizado para la detección de anticuerpos de IBR. La prevalencia global fue de 22.85% y la prevalencia para ranchos fue de 58.70%. Los Municipios de Anáhuac y Ramones presentaron la prevalencia más alta de 33.33% (Cantú, C.A., 2002).

2.2.2 BoHV-1 en Tamaulipas

En investigaciones en el área de salud animal y epidemiología de enfermedades que afectan la reproducción en los bovinos, en el Campo Experimental Aldama se realizo un estudio en el año 1990, donde fueron muestreados algunos ranchos del municipio de Aldama donde existían problemas reproductivos, se encontró una prevalencia del 51% indicando la presencia del virus en algunas explotaciones.

Se continúo con un estudio mediante la prueba de seroneutralización con la finalidad de conocer el comportamiento epidemiológico y profundizar más en el conocimiento de las enfermedades de tipo reproductivo, donde los objetivos fueron conocer el cambio existente en la prevalencia, así como aquellos factores que están influyendo en la presencia y distribución de estos padecimientos, dentro de esos resultados en 1996 donde se muestreó ranchos de tres municipios del sur de Tamaulipas, en un muestreo realizado al azar de 423 hembras bovinas las

prevalencias fueron altas, Aldama tuvo 51%, González 55% y Altamira con 27% (Covarrubias, C.A., 2002).

2.3 Mecanismos de Propagación del BoHV-1

El BoHV-1, igual que muchos *Alphaherpesvirus*, ha desarrollado un ciclo vital muy complejo que incluye la infección de por vida del sistema nervioso periférico del organismo hospedador (Serra, H. X., 2004).

La entrada principal del BoHV-1 es en cualquiera de las membranas mucosas de tracto respiratorio superior o genital (según sea el subtipo del virus). El BoHV-1 se transmite fácilmente en forma directa de un animal a otro, pues gran cantidad de virus se disemina principalmente por secreciones respiratorias, mediante el aire en forma de aerosol en distancias cortas, por secreciones oculares y reproductivas de animales infectados, pero también puede hacerlo en forma indirecta, a través de personas o equipos (Serra, H. X., 2004; Pidone, C. L., et al., 1999; Muylkens, B., et al., 2007).

La infección genital requiere un contacto directo en el apareamiento. La transmisión genital puede ocurrir mediante el semen contaminado por el virus y la transferencia embrionaria. La infecciosidad del BoHV-1 permanece estable durante el almacenamiento del semen en nitrógeno líquido. Se ha observado que no disminuye la titulación viral en el semen cuando es almacenado durante un año (Lata J., 2006). Se ha podido comprobar que toros serológicamente positivos sin sintomatología son portadores del virus, el que se ha logrado aislar de muestras de semen congelado, incluso 12 meses después de su almacenamiento a -196° C. Debido a la infectividad del virus en la criopreservación, es necesario que los toros usados para inseminación

artificial estén libres de BoHV-1 (Pidone, C. L., et al., 1999; Muylkens, B., et al., 2007).

La vía de entrada natural de la infección por BoHV-1 resulta en una producción masiva de virus. Nueva progenie de virus son propagados en el moco nasal excretados en altos títulos y son responsables por la rápida diseminación de la infección dentro del ganado bovino. La nueva progenie también se extiende dentro del animal infectado mediante la diseminación local, la propagación sistémica por la viremia ganando acceso a un más amplio rango de tejidos y órganos y eventualmente la neuroinvasión. El período de incubación varía entre 2 y 6 días, pues depende de la dosis, ruta de inoculación y otros factores. Aunque se acepta que, para el caso de la IBR, el virus se disemina en las secreciones nasales por aproximadamente 12-14 días pi, se ha recuperado el virus en forma intermitente por un período de hasta 578 días (Pidone, C. L., et al., 1999; Muylkens, B., et al., 2007).

El BoHV-1 infecta y replica en las mucosas del tracto respiratorio superior o de los genitales antes de entrar en el sistema nervioso o de infectar órganos que alcanza mediante viremia. Las descargas serosas nasales y genitales transportan viriones de BoHV-1 que pueden transmitir la enfermedad a otros animales. Los viriones también pueden invadir nódulos y vasos linfáticos e inducir una viremia asociada a linfocitos que da pie a la infección sistémica del animal. Los toros comienzan diseminando el BoHV-1 del prepucio entre el día 2 al 7 después de la primera infección intraprepucial. No obstante, la diseminación espontánea intermitente del virus se ha observado con frecuencia. Además, los toros infectados de forma latente pueden ser reactivados para que diseminen el virus por el estrés, el transporte o el tratamiento de corticosteroides. Tales periodos espontáneos o

inducidos artificialmente la diseminación del virus intermitente a menudo pasan clínicamente de forma inadvertida y sin ser detectados por largos periodos, incluso durante años después de la infección primaria (Pidone, C. L., et al., 1999; Muylkens, B., et al., 2007).

El semen muy probablemente se contamina por el virus que se replica en la mucosa del prepucio y del pene, antes que por el virus producido en el testículo, epidídimo o glándulas sexuales accesorias. El BoHV-1 es excretado en mucha mayor concentración en la fase primaria de la infección que en fases posteriores cuando la diseminación es a menudo intermitente. Se han encontrado en semen títulos virales algo más bajos que en los lavados prepuciales. La dosis necesaria para infectar al ganado después de la inoculación intranasal o vaginal con una cepa de BoHV-1 ha sido estimada en que sea 3.2 TCID₅₀ (Dosis Infectiva en Cultivo de Tejidos 50) (Lata, J., 2006).

El bovino es el principal reservorio del BoHV-1; sin embargo, muchas especies de rumiantes caprinos, ovinos, etc., e incluso el cerdo, son susceptibles a este virus (Pidone, C. L., 1999). Estudios seroepidemiológicos se han realizado en otras especies domesticas o de rumiantes silvestres, con el fin de investigar si estos animales podrían ser reservorios potenciales de BoHV-1. Anticuerpos contra BoHV-1 han sido detectados en muchas especies de rumiantes. Además, varios *Alphaherpesvirus* de rumiantes relacionados a BoHV-1 han sido aislados y caracterizados (Thiry, J., et al., 2006).

Una de las principales diferencias para el control de esta enfermedad es que los animales infectados transportan al virus de por vida, ya que el BoHV-1 permanece integrado por un período indefinido en células preferenciales. En primer lugar es necesario definir la decisión de controlar la enfermedad clínica o eliminar la infección. La vacunación protege contra la primera pero no contra la segunda. Si se decide vacunar se debe considerar que la vacunación no previene la superinfección con cepas de campo, el estado inmunitario que provee una vacuna influye en la reexcreción de virus latente, la posibilidad de eventos tales como recombinación entre cepa vacunal y de campo y la reversión a cepa virulenta no puede ser excluida, y salvo que existan marcadores específicos en las cepas vacúnales o diferentes patrones de restricción de ADN, los anticuerpos resultantes de la vacuna no permiten la utilización de análisis serológicos que diferencien cepas vacúnales de cepas de campo en los programas de control y erradicación (Pidone, C. L., et al., 1999).

2.4 Taxonomía y Biología Molecular del BoHV-1

2.4.1 Taxonomía

Los miembros de la familia *Herpesviridae* son virus DNA que muestran una exitosa evolución espectacular. El nombre, derivado del griego $\sigma\eta\rho\epsilon\iota\sigma$ (herpein) “arrastrar o reptar”, se refiere a la característica de las lesiones causadas por dos comunes herpesvirus humanos: ampollas-fiebre causada por el herpesvirus simple (HSV), así como la varicela y el herpes inducido el virus varicela-zoster (VZV). Esta familia viral incluye cerca de doscientos aislados de huéspedes tan diversos como los moluscos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. En la naturaleza, la

mayoría de los herpesvirus son estrechamente relacionados con una única especie hospedadora, y casi todos los animales hospedadores investigados a la fecha confirman infecciones por al menos una especie de herpesvirus. La familia *Herpesviridae* está dividida en tres subfamilias, llamadas *Alpha*, *Beta* y *Gammaherpesvirinae*. La subfamilia *Alphaherpesvirinae* contiene cuatro géneros: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*. Esta subfamilia incluye virus caracterizados por una amplia gama de huéspedes, un ciclo de replicación corto y la capacidad de inducir infección latente, pero no exclusivamente en las neuronas (Thiry, J., et al., 2006).

El BoHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*, comparte ciertas propiedades biológicas con el herpesvirus simple tipo 1 (HSV-1) y HSV-2. El BoHV-1 contiene tres subtipos 1.1, 1.2a y 1.2b (Lovato, L., et al., 2003; Pidone, C. L., et al., 1999; Lata, J., 2006).

2.4.2 Biología Molecular

El BoHV-1, es un virus con genoma DNA de doble cadena consiste en aproximadamente 136 – 140 pares de kilobases (kbp), presenta una ordenación del tipo D que se caracteriza por la repetición interna y en orientación invertida de la secuencia de unos de extremos de la molécula de DNA, comprendiendo una región única larga (UL) de 104 kbp y una región corta que contiene un segmento único (Us) de 10 kbp flanqueado por repeticiones terminales invertidas e internas y (IR, TR) de 11 kb cada una. Esto permite que la secuencia Us invierta en relación a la secuencia UL, dando así lugar a dos formas de isómeros del genoma. La secuencia comprende

de 67 genes únicos y dos genes, ambos duplicados, en repeticiones invertidas. Así, el BoHV-1 codifica al menos 69 proteínas. La mayoría de los genes muestra homología en la secuencia y se producen en el mismo orden como con su homólogo el herpesvirus simple 1 (HSV-1). Se ha estimado un 85 % de similitud entre los BoHV-1 y BoHV-5 y más del 95 % de similitud entre los BoHV-1.1 y 1.2 (Pidone, C. L., 1999). Los genes del BoHV-1 han sido nombrados después de su homólogo HSV-1 según la nomenclatura existente (Serra, H. X., 2004; Lata, J., 2006).

Todos los genes del BoHV-1 son clasificados en dos categorías principales basados en el impacto de la supresión de un solo gen en la habilidad de los virus mutantes para crecer en cultivo celular. Los genes no esenciales son aquellos que permiten un mayor crecimiento in vitro de las correspondientes supresiones de mutantes. Los genes esenciales son los genes cuya supresión conduce a una no letal replicación mutante del BoHV-1. La clasificación de una proteína del BoHV-1 no siempre es definitiva y no necesariamente conservada en relación a los Alphaherpesvirus (Muylkens, B., et al., 2007). El genoma del BoHV-1 contiene al menos 10 genes con el potencial para codificar las glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK y gM. El peso molecular previsto del correspondiente producto de los genes oscila de 17 a 101 kDa. Sin embargo, sus dimensiones observadas son más grandes debido a que contienen N- además de oligosacáridos O-ligado y puede formar estructuras similares a los especificados por HSV-1. Debido a su ubicación en la envoltura del virión y en la superficie de las células infectadas, estas glicoproteínas son objetivos importantes para la respuesta inmune del huésped. Además, juegan un papel importante en la patogenicidad por la mediación de entrada del virión en la célula hospedadora, la fusión celular y la propagación célula-célula del virus (Lata J.,

2006). Algunas glicoproteínas también tienen propiedades inmunogénicas, lo que permite su uso como componentes de vacunas o pruebas de diagnóstico. La mayoría de las glicoproteínas del BoHV-1 ya han sido caracterizadas. El segmento UL incluye genes que codifican las glicoproteínas gB (UL27), gC (UL44), gH (UL22), gL (UL1), gK (UL53) y gM (UL10), mientras que cuatro genes correspondientes a gG (US4), gD (US6), gI (US7) y gE (US8) son agrupados en una organización tándem en el segmento US. Varias construcciones de virus mutantes han demostrado que gC, gI, gE, gG y gM son glicoproteínas no esenciales. Por el contrario, la supresión del gen que codifica cualquiera de gB o gD o gH reduce la capacidad de replicación in vitro (Thiry, J., et al., 2006).

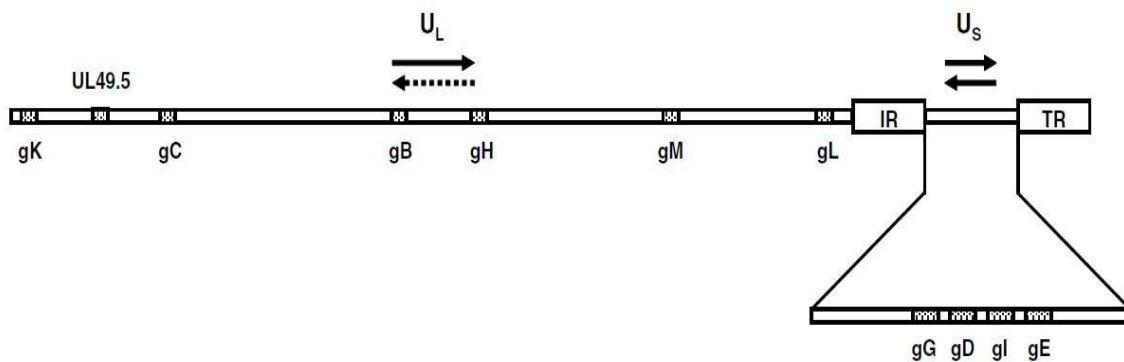


Figura 1. Organización del genoma de los Alphaherpesvirus (Thiry, J., 2006).

Los viriones del BoHV-1 presentan cuatro estructuras morfológicas diferenciadas. El núcleo compuesto por una molécula lineal de DNA doble-hebra,

permanece encerrado y protegido por una cápside icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro compuesto de 150 hexámeros y 12 pentámeros, lo cual a su vez está rodeada por una capa proteica formada por más de 15 proteínas distintas llamada tegumento. La partícula vírica está rodeada por una envoltura lipídica que contiene proteínas víricas en su mayoría glicosiladas. El virión está compuesto por más de 30 proteínas distintas, entre las glicoproteínas gB, gC y gD son las más abundantes. Un virión maduro mide entre 120 a 300 nm de diámetro (Serra, H. X., 2004; Thiry, J., et al., 2006).

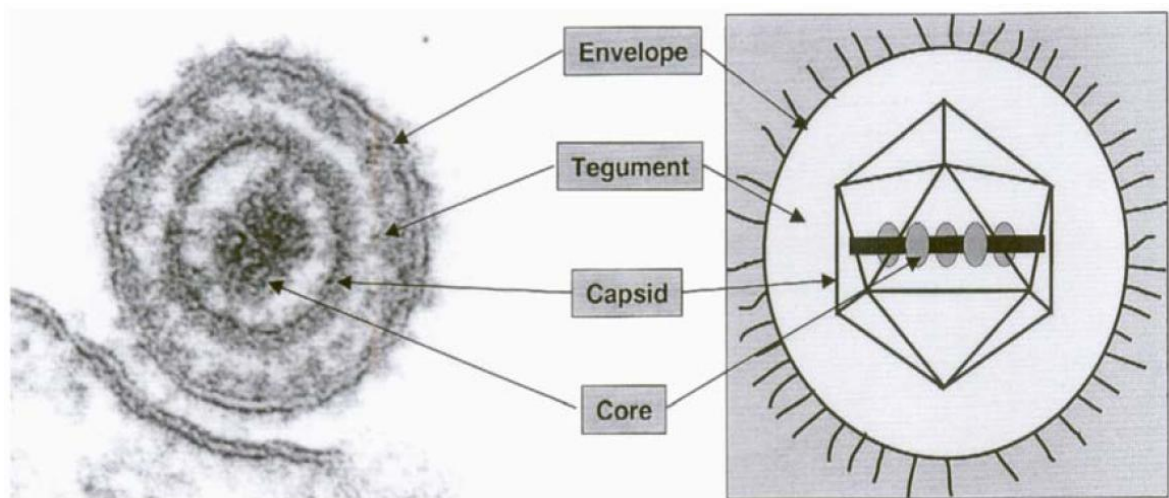


Figura 2. Morfología de un virión de Herpesvirus (Serra, H. X., 2004).

La gD es la glicoproteína más importante involucrada en la neutralización. Aparentemente es esta glicoproteína la responsable de la penetración del virus en la célula huésped y también se le atribuye participación en la adsorción viral y la fusión celular. La gD es considerada como esencial en el BoHV-1 mientras no es codificada por el virus Varicela-Zoster (VZV) y no es esencial en el virus de la enfermedad de

Marek's (MDV). La gE se conoce como una proteína no esencial en el BoHV-1 mientras es esencial en VZV (Muylkens, B., et al., 2007). La gC participa como responsable de la unión inicial del virus a receptores similares a la heparina sobre la superficie de las células permisivas y la gB interferiría con proteínas celulares responsables de efectos citopáticos (ECP) ocasionados por la infección con el BoHV-1 (Pidone, C. L., et al., 1999).

2.4.2.1 Replicación Viral

El BoHV-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular. La infección de las células permisivas por el BoHV-1 es iniciado por un proceso de entrada de tres pasos. El primero es la interacción que implica baja afinidad de la adhesión del virus entre la gB y/o la gC a las estructuras de la superficie celular como mitades azúcar heparán sulfato. Esto es seguido por la unión estable de la gD del BoHV-1 a receptores específicos celulares. Una extensa selección de receptores han sido identificados como objetivos potenciales para la interacción de la gD en diferentes alphaherpesvirus. Aunque este amplio repertorio incluye por lo menos cuatro clases de moléculas, solo nectin-1 (un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas) sirve como receptor de entrada para BoHV-1. Después de esta interacción de alta afinidad entre gD y receptores celulares, la subsecuente penetración del virus ocurre por fusión a la envoltura del virión con la membrana plasmática. Este proceso crucial requiere por lo menos la participación de cuatro glicoproteínas del BoHV-1: gD, gB, gH y gL.

La proteína del tegumento VP16 (proteína del virión 16) conocida como α -TIF (factor transactivador de los genes alfa) del BoHV-1, es responsable del inicio de la expresión génica por la transactivación de los genes (alfa genes) inmediatos tempranos (IE) del BoHV-1. La expresión génica del BoHV-1 es regulada temporalmente durante la infección. Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura y tegumento. Luego son transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula. La cascada de la expresión genética incluye la cinética expresión de tres genes, dando lugar sucesivamente IE, tempranos (E), y tardíos (L). Ellos codifican proteínas involucradas respectivamente y principalmente en la regulación del ciclo viral en la replicación del DNA viral y en la morfogénesis de nuevos viriones (Muylkens, B., et al., 2007; Ruiz, J., et al., 2008).

2.5 Modelos de Infección del BoHV-1

2.5.1 Infección Aguda

La gravedad de la enfermedad causada por el BoHV-1 es influenciada por varios factores tales como la virulencia de la cepa del BoHV-1, resistencia del huésped, especialmente la edad y el presente potencial de la infección bacteriana. Las infecciones subclínicas del BoHV-1 son comunes, varias cepas muestran poca capacidad para inducir signos clínicos y se clasifican como cepas virulentas débiles, estos cuadros clínicos discretos también pueden ser explicados por la infección primaria de becerros pasivamente inmunes en países donde el BoHV-1 es endémico.

La inmunidad del calostro se sabe que protege eficazmente animales infectados de los signos clínicos (Muylkens, B., et al., 2007). Los subtipos del BoHV-1 están asociados a diversos cuadros clínicos, el subtipo 1.1 (causa infecciones respiratorias y abortos), 1.2 (causa infecciones respiratorias y genitales) incluyendo también el 1.2a y 1.2b. (Serra, H.X., 2004; Wang, J., et al., 2006; Vogel, F.S.F., et al., 2004).

La rinitis infecciosa bovina (IBR) es una infección contagiosa y aguda, los animales infectados presentan fiebre (40.5 – 42° C), depresión, inapetencia, descenso en la producción láctea, abundante flujo nasal y emaciación. Las lesiones comúnmente se describen como rinitis necrótica aguda, faringitis y laringotraqueitis. La mucosa nasal es observada hiperémica (red nose) con pequeñas pustulas necróticas, también se puede observar conjuntivitis unilateral o bilateral que puede confundirse fácilmente con una queratoconjuntivitis causada por *Moraxella bovis*, abundante lagrimeo y opacidad corneal. Los signos concuerdan con la respuesta inflamatoria y el epitelio dañado por el BoHV-1 en sitios de replicación primaria. En los casos de una infección más aguda la necrosis evoluciona y forma grandes zonas hemorrágicas y ulceraciones en la mucosa provocando posibles infecciones secundarias que pueden ocasionar una bronconeumonía, las lesiones de la cavidad nasal son cubiertas por una membrana diftérica de color cremoso y el flujo nasal se convierte a mucopurulento acumulándose en las vías respiratorias. El animal posteriormente padece disnea, respiración por boca, salivación y profunda tos bronquial. En los casos de infecciones más agudas la IBR presenta una morbilidad del 100% y una mortalidad del 10% (Pidone, C. L., et al., 1999; Serra, W.X., 2004; Muylkens, B., et al., 2007).



Figura 3. Signos clínicos en animales infectados por IBR.

(A) Bovino en fase aguda con secreción nasal cristalina. B) Bovino con congestión hemorrágica en la nariz y salivación profusa. (C) Bovino con conjuntivitis (Serra, W.X., 2004).

La forma genital del BoHV-1 es generalmente transmitida en el apareamiento. Los nombres dados a las enfermedades que afectan a la vaca y al toro describen claramente los cuadros clínicos observados. En las vacas infectadas se presenta la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), presentan fiebre, depresión, anorexia y micciones frecuentes y dolorosas, la vulva se observa edematosa e hiperémica, la mucosa genital presenta pequeñas pústulas de necrosis que pueden evolucionar y presentar grandes úlceras, en los casos más agudos las ulceraciones pueden presentar infecciones bacterianas secundarias, flujo mucopurulento, intensa inflamación del tracto reproductor de la vaca, endometritis, infertilidad transitoria. Los animales rehúyen rechazan totalmente la copula cuando las lesiones son extensas y de tipo agudo. La fase aguda de la enfermedad suele durar de 2 a 4 días y las lesiones desaparecen de 10 a 14 días después. La infección causada por el BoHV-1 puede provocar aborto en vacas gestantes generalmente entre el 4^o y 8^o mes de gestación después de un periodo de incubación de 3 a 6 semanas y hacerlas

susceptibles a desarrollar la enfermedad de IBR. Los fetos abortados presentan autólisis, coloración parduzca, tejidos friables, lesiones constantes en el hígado y fluidos en las cavidades corporales como hallazgos característicos. Las cepas BoHV-1.1 y BoHV-1.2a han sido asociadas con un potencial abortígeno. En los toros se presenta la balanopostitis pustular infecciosa (IPB), la síntomas son orquitis, inflamación en el pene y prepucio (Pidone, C. L., et al., 1999; Serra, W.X., 2004; Muylkens, B., et al., 2007).

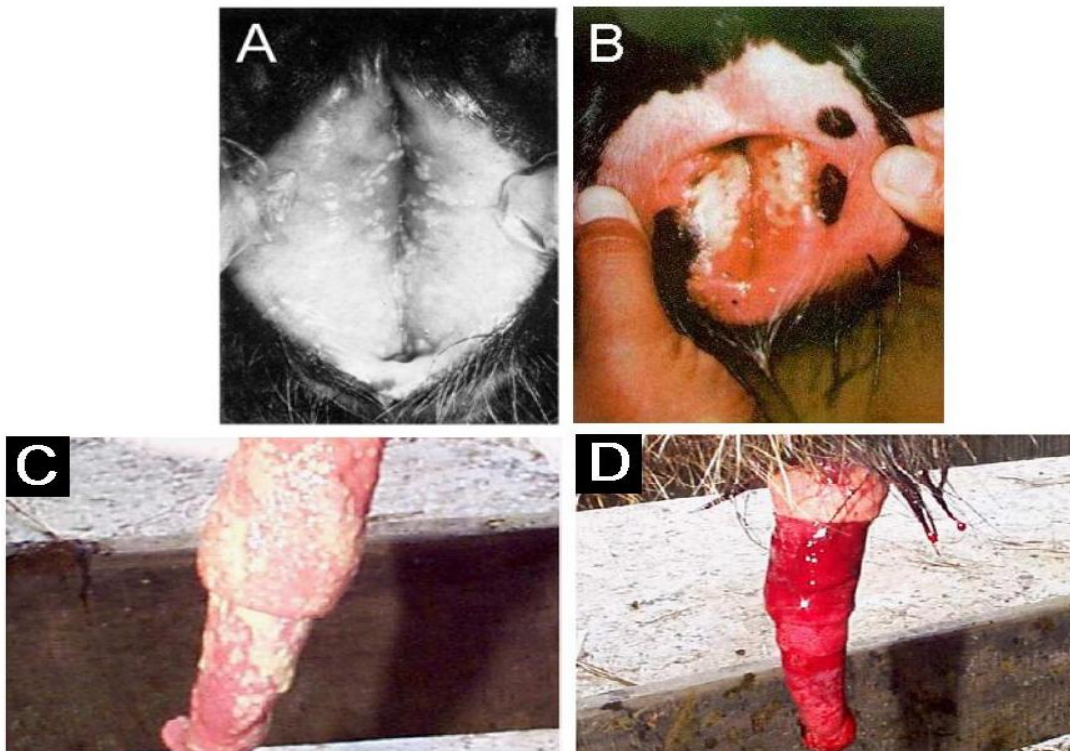


Figura 4. Forma genital de la infección por BoHV-1. (A y B) vulvovaginitis pustular infecciosa IPV. (C) balanopostitis pustular infecciosa IPB. (D) hemorragia extensa y ulceración en la mucosa del pene y prepucio (Serra, H.X., 2004; Vogel, F.S.F., 2004).

En los terneros durante la gestación o al poco tiempo de nacer, pueden llegar a infectarse por el BoHV-1, desarrollan una infección sistémica, descargas oculares y

nasales, insuficiencia respiratoria, lesiones necróticas en la mucosa del aparato digestivo, peritonitis, diarrea difusa, incoordinación y convulsiones que normalmente provocan la muerte. Los terneros privados del calostro están principalmente en riesgo. La salivación excesiva y la diarrea son consecuencias de la replicación del BoHV-1 en el epitelio de los órganos digestivos que no son objetivos comunes para el BoHV-1. Se observan varias lesiones como glositis, esofagitis y una ruminitis aguda necrotizante. El resultado es fatal dentro de 4 a 5 días, los terneros mueren en estado moribundo (Pidone, C. L., et al., 1999; Serra, W.X., 2004; Muylkens, B., et al., 2007).

2.5.2 Infección Latente

Una vez que el BoHV-1 ingresa al organismo y se multiplica en el sitio de infección, se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro lumbares, siendo estos los sitios primarios en donde permanece en un estado latente. Los nódulos linfáticos, la mucosa nasal, tejido esplénico y las células mononucleares de sangre periférica, se ha evidenciado que también se consideran sitios de latencia aun en ausencia de la enfermedad productiva. Los viriones pueden entrar en el sistema nervioso fusionando su envoltura con la membrana plasmática de las neuronas que inervan el tejido infectado, dentro de la neurona, la nucleocápside y parte del tegumento se desplazan a través de los microtúbulos de los axones mediante transporte retrogrado hasta alcanzar el soma, en el soma de la neurona, la nucleocápside inyecta el genoma viral en el núcleo entrando en un estado de transcripción restringida, el cual le permite evadir la respuesta inmune del huésped y el BoHV-1 establece entonces una infección latente

de por vida en el organismo hospedador. Otros sitios en el organismo como el tejido epitelial y leucocitos, también se citan como lugares de alojamiento viral. La latencia se define como un periodo durante el cual no es posible detectar virus infecciosos mediante los procedimientos estándar de aislamiento viral, y en general tampoco hay expresión de los genes virales necesarios para el establecimiento de una infección productiva. La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por estímulos naturales o artificiales como el estrés, parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticosteroides, superinfección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, tratamiento con ciclofosfamida, etc, y consiste en la reactivación del genoma viral latente y se sintetizan nuevos viriones que mediante transporte anterógrado alcanzan y reinfectan las células epiteliales periféricas, culminando en recurrentes transmisiones del virus a animales no infectados generalmente sin signos clínicos. La reactivación inducida por los glucocorticoides (dexametasona) se origina como consecuencia de un mecanismo indirecto vía supresión de funciones de neutrofilos y linfocitos. Generalmente no se presentan signos clínicos durante la reexcreción del virus latente. Una vez reactivado el BoHV-1 en las neuronas del ganglio trigémino, inicia un nuevo ciclo de replicación. Después de la reactivación viral es posible evidenciar la expresión de genes virales en neuronas sensoriales infectadas y aislar el virus infeccioso del ganglio trigémino y secreciones nasales, oculares, etc. Por analogía a observaciones en la latencia y reactivación del HSV-1, se cree que el sistema inmune juega un papel importante en el ciclo latencia-reactivación del BoHV-1.

En contraste con los 70 u 80 genes virales que se expresan durante una infección lítica de células bovinas, la expresión de estos genes disminuye drásticamente durante la latencia. Los animales con bajos niveles de inmunidad específica muestran signos clínicos más severos y excretan mayores niveles de virus luego de la reactivación. La latencia es una de las características principales que condicionan la patogenia del BoHV-1 (Pidone, C. L., et al., 1999; Serra, W. X., 2004; Lata, J., 2006; Muylkens, B., et al., 2007; Ruiz, J., et al., 2008).

2.6 Diagnóstico

En el aspecto clínico, un síntoma muy característico de la enfermedad del BoHV-1 es la formación de pequeñas lesiones necróticas blanquecinas en las mucosas nasales, genitales y en la conjuntiva ocular. Un diagnóstico etiológico específico del BoHV-1 además del examen e historial clínico, requiere el aislamiento del virus y el resultado confirmatorio de pruebas de laboratorio (Serra, H. X., 2004).

Las pruebas serológicas se pueden utilizar para diferentes fines: para diagnosticar una infección aguda, para demostrar la ausencia de infección, para determinar la prevalencia de la infección en estudios seroepidemiológicos, para apoyar programas de erradicación y el control subsiguiente y para propósitos de investigación. Las pruebas utilizadas más ampliamente para la detección de anticuerpos son las de neutralización del virus y varios tipos de enzimoimmunoensayos (ELISAs). Los anticuerpos se pueden detectar en la leche con un método ELISA. Los métodos ELISAs, incluyendo el gE-ELISA, se utilizan cada vez más para detectar anticuerpos en muestras de leche entera, pero presentan

algunas limitaciones. Se ha informado del estudio de muchas variantes de esta técnica que incluyen el formato directo, indirecto y de competencia, los beneficios de esta prueba son la rapidez para la realización de la misma, el costo y la sensibilidad, y algunas deficiencias son que no distingue entre anticuerpos naturales y los vacúnales y que es de baja especificidad. También hay disponible una prueba indirecta que es la técnica de seroneutralización la cual se basa en buscar anticuerpos específicos contra el virus, además de ser sensible y de poder distinguir entre anticuerpos vacúnales de los naturales (Serra, H. X., 2004; OIE., 2008).

La técnica de Aislamiento Viral se realiza empleando varios tipos de cultivos celulares, identificándose luego el agente etiológico por medio de otras pruebas inmunológicas. Los cultivos celulares se observan diariamente para ECP. Se caracteriza por la agrupación de células redondeadas en forma de racimos que se juntan alrededor de un hueco en la monocapa; a veces, se pueden observar células gigantes con varios núcleos. Para aislar los virus, se pueden utilizar varios tipos de cultivos celulares. Resultan adecuadas las células primarias o secundarias de riñón de bovino, de pulmón o de testículos, las cepas celulares derivadas de pulmón fetal bovino, cornetes nasales o tráquea, y las líneas celulares establecidas, como la línea celular Madin-Darby de riñón bovino (MDBK). Una de sus desventajas es en el tiempo para obtener los resultados de la prueba que es alrededor de 7 días (Pidone, C. L., et al., 1999; OIE., 2008).

La prueba de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que sirve para amplificar e identificar alguna región del genoma del DNA viral de alguna muestra extraída, es una prueba con alta especificidad, es rápida comparada con el aislamiento además de tener menos riesgos de contaminación, esta técnica es

desarrollada para usarse en diferentes tipos de muestras clínicas lo que la distingue de ser una prueba muy versátil comparada con otras pruebas de diagnóstico. Además, tiene un límite de detección de tan solo tres moléculas. En comparación con el aislamiento de virus, la PCR tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida: puede realizarse en 1-2 días. La desventaja es que es fácil de contaminar y por consiguiente hay que tomar medidas para evitar falsos resultados positivos. Hasta la fecha la PCR se ha utilizado principalmente para detectar DNA del BoHV-1 en muestras de semen infectado artificial o naturalmente (Serra, H. X., 2004; Kahrs, R.F., 2001; Pidone, C. L., et al., 1999; OIE., 2008).

Otras pruebas empleadas de forma directa son la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia es una técnica muy empleada cuya ventaja principal es la rapidez del diagnóstico, el cual no necesita una posterior caracterización viral, una de sus desventajas puede ser menos sensible que el aislamiento viral. Los subtipos 1 y 2b del BoHV-1 se pueden diferenciar mediante anticuerpos monoclonales, por inmunofluorescencia, radioinmunoprecipitación, inmunoperoxidasa o pruebas de inmunotransferencia. El análisis con endonucleasas de restricción permite diferenciar entre todos los subtipos reconocidos de BHV1 (Serra, H. X., 2004; Kahrs, R.F., 2001; Pidone, C. L., et al., 1999; OIE., 2008).

La prueba de real time PCR ha sido desarrollada para detectar el BoHV-1 en semen de bovinos destinados al comercio. Numerosos estudios han demostrado que las pruebas de PCR son más sensibles que el aislamiento viral. La prueba de real time PCR se ha utilizado para la detección del BoHV-1 en bovinos infectados experimentalmente y en ratones. La prueba de real time PCR difiere del PCR

estándar en que los productos PCR amplificados son detectados directamente durante el ciclo de amplificación utilizando una sonda de hibridación, que mejora la especificidad e la prueba. Las pruebas de real time PCR tiene varias ventajas sobre los métodos de PCR convencionales, real time PCR usando solo un par de primers es capaz de proporcionar una sensibilidad cercana o igual a los métodos de nested PCR con un riesgo mucho menor de contaminación. La amplificación y detección del objetivo es llevado a cabo de forma simultánea. No hay una post-amplificación en el manejo del producto de PCR, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación, y es posible para realizar análisis cuantitativos con sistemas de real time PCR. Esta prueba de real time PCR es capaz de detectar el DNA viral de todas las cepas del BoHV-1, incluyendo el subtipo 1 y 2, de semen de bovino (OIE., 2008).

El desarrollo de estas y otras posibles técnicas de diagnóstico es fundamental para lograr la prevención, el control y la erradicación de esta enfermedad (Pidone, C. L., et al., 1999).

3 Materiales y Métodos

3.1 Lugar de realización de la investigación

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio del Departamento de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (coordenadas +25° 47' 2.58", -100° 17' 12.70", Google Maps, 2009) y en el Laboratorio de Cultivo de Células del Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León (coordenadas +25° 40' 45.38", -100° 14' 48.77", Google Maps, 2009).

3.2. Características de los hatos y bioseguridad

Los ranchos sometidos al estudio tienen más de 15 años de haberse constituido con su actual dueño. El número promedio de bovinos por hato fue de 168.2. La condición corporal general se estimó ocurrió entre 3 y 4 al momento del muestreo. En todos los casos, los animales se alimentan de un agostadero con suplementación a base de sales mineralizadas de forma no constante y/o administradas cuando, a criterio del manejador, los animales muestren una condición corporal pobre. Todos los ranchos son hatos "abiertos", es decir permiten el ingreso de animales de otras fuentes en número variable que oscila entre 5-15 animales a intervalos irregulares; además animales de estos hatos, que los han mostrado en exposiciones y ferias ganaderas, han retornado al rancho sin realizar pruebas de laboratorio contra enfermedades y/o cuarentena. El manejo en general, es el típico aplicado en la región en el cuál se incluyen vacunación dos veces al año contra enfermedades clostridiales, desparasitación interna contra nematodos y externa

contra garrapatas. Los baños anti-garrapatas se realizan en promedio cada 2 meses. No obstante, en la mayoría de los hatos se decide la aplicación de agentes químicos acaricidas acorde al grado de infestación y criterio del administrador, por lo que se realiza de forma irregular durante el año. La proporción de bovinos muertos debido a enfermedades transmitida por garrapata en los ranchos se estimó ocurre en rangos de 15-25% durante todo el año. La aplicación de vitaminas u otros coadyuvantes de desarrollo se aplican dos veces al año y coincide con, ya sea la vacunación anti-clostridios y / o desparasitación interna. En ocasiones la aplicación de vitaminas se realiza a discreción a ciertos animales con signos evidentes de desnutrición o enfermedad. La administración parenteral de medicamentos se realiza mediante el uso de agujas que se comparten entre varios animales. En todos los casos, los administradores refieren la eventual pérdida de la “cadena fría durante el manejo y aplicación de biológicos. Tanto los químicos como los biológicos son obtenidos de diferentes fuentes comerciales dependiendo del costo y disponibilidad de recursos. Todos los hatos están inscritos en los programas oficiales de control y erradicación de tuberculosis (Tb) y brucelosis (Br) y desde 4 años cuentan con status de hato libre contra estas enfermedades. Los animales que ingresan a sus respectivos hatos solo se les requisa que procedan de hatos libres de Tb y Br y que los mismos resulten negativos acorde a la papelería oficial. No se realizan la cuarentena ni el análisis de laboratorio para determinar el estado sanitario con respecto a patologías infecciosas, particularmente reproductivas y en especial contra el BoHV-1. Bajo entrevista con los manejadores de cada uno de los hatos, todos los hatos analizados contaban con antecedentes de haber sido vacunados contra BoHV-1 y otras enfermedades reproductivas y respiratorias, pero no existe un esquema de vacunación ni datos de

fechas exactas de vacunación. En todos los casos, se refiere a que la última vez que administraron vacunas contra BoHV-1 y otras enfermedades respiratorias y reproductivas fue hace más de un año y que no se practicó la revacunación. Igualmente, no existen datos sobre el tipo de vacuna, laboratorio ó marca. La vacunación contra el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) no es frecuente ni consistente, en cada uno de los hatos no se cuenta con estudios serológicos previos frente al BoHV-1. Bajo encuesta, a los manejadores de cada uno de los ranchos, aparentemente no ocurren antecedentes de tasas elevadas de fallas reproductivas, sin embargo esa información no fue cuantificada para el propósito de este estudio. En todos los ranchos, se reportó el uso frecuente de tecnologías de reproducción en bovinos (Inseminación Artificial [IA], Transferencia de Embriones [TE]).

Se determinó que en los ranchos estudiados no cuenta con un plan de bioseguridad contra BoHV-1 y otras enfermedades reproductivas y respiratorias. Entre otros, no se aplica cuarentena a los animales de recién ingreso, no existen protocolos de vacunación definida, los animales salen y entran (exposiciones) sin análisis de laboratorio previos, entre otros. En todos los casos, los hatos cuentan con otras especies de animales entre los que se incluyen equinos, caninos, cierta fauna nociva (roedores, coyotes, crotálidos) y aves domésticas (gallinas) y silvestres (acuáticas y no acuáticas). El rancho no cuenta con un médico veterinario de base y los problemas relativos al manejo de enfermedades se realiza bajo consulta a diferentes instancias. Dada la imposibilidad de determinar si los anticuerpos anti-BoHV-1 en un animal proceden de infecciones de campo o de vacunaciones previas ó ambas, se consideró que todos los hatos son seropositivos y que cuando menos

contenían un animal seropositivo al virus. Un estudio previo de los hatos analizados en la zona de estudio determinó que más del 80% de los hatos son seropositivos y que hatos con más de 100 bovinos tienen una probabilidad mayor de riesgo de seropositividad (Domínguez, D.D., 2009).

3.3 Muestras

3.3.1 Número de muestras y procedencia

Se incluyeron 65 muestras de fluido seminal de igual número de ejemplares bovinos usados como sementales. Los animales procedían de 15 hatos cuyo fin zootécnico es la producción de animales de registro. Las razas de los bovinos correspondieron a la Beefmaster, Charbray, Simbrah y Charolais. La edad promedio de los animales fue de 45 meses. Los hatos analizados están ubicados en los Municipios de China, Dr. González, General Bravo y Vallecillo del Estado de Nuevo León y en Ciudad Mier del Estado de Tamaulipas.

3.3.2 Colección y manejo de las muestras

3.3.2.1 Colección mediante el uso del Electroeyaculador

La colección de muestras del líquido seminal se realizó con la ayuda de un electroeyaculador (www.minitube.com). El estímulo eléctrico consistió en una serie de repeticiones de descargas que variaron entre 5–9 Volts y el tiempo de duración de cada repetición varió entre 30 y 60 segundos según las condiciones naturales de cada animal; el procedimiento de extracción se realizó bajo medidas sanitarias. El

semen se captó en bolsas plásticas estériles de 10x15 cm en un brazo recolector (figura 5), posteriormente él semen fue depositado en tubos de vidrio estériles de 7 ml previamente identificados. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración con la ayuda de geles refrigerantes almacenados en una hielera de poliuretano.



Figura 5. Obtención de fluido seminal mediante electroeyaculación de un semental bovino.

3.3.2.2 Manejo de las Muestras

Para el manejo de cada una de las muestras se siguieron las recomendaciones descritas por la OIE (OIE., 2008). En el laboratorio, el semen fresco fue depositado en tubos cónicos de plástico (Falcon®) y agitado brevemente durante 5 minutos a temperatura de cuarto, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1,500 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y filtrado a través de una membrana de 0.45µm (Acrodisc® Syringe Filters, PALL Co.). Las muestras fueron distribuidas en alícuotas de 1ml en tubos cónicos de plástico (Eppendorf®) de 1.5 ml y previa identificación fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

3.4 Cultivo de células MDBK

3.4.1 Control de calidad de suero fetal bovino (SFB)

Este procedimiento se basó en el protocolo estándar de trabajo recomendado por el laboratorio de Diagnóstico del Instituto de Virología de la Universidad de Giessen, Alemania (Clave: DL-AV-008/2/FBS, M. König; 2010). El objetivo principal de este protocolo consiste en evaluar la capacidad del SFB para el desarrollo y mantenimiento de las células indicadoras (MDBK), con el propósito de: determinar la presencia de BoHV-1 en el SFB empleando en el aislamiento viral, comprobar la existencia de anticuerpos neutralizantes contra BoHV-1 utilizando la técnica de seroneutralización y aplicar la prueba de PCR para evidenciar DNA viral en el SFB empleado.

3.4.2 Línea celular y su cultivo

Se empleó la línea celular de riñón de bovino “Madin-Darby” (MDBK) (CCL 22, NBL-1) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular fue analizada para determinar la ausencia de los virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) citopáticos y no citopáticos, del Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1) y de bacterias y micoplasmas. El manejo de las células se realizó bajo una campana de flujo laminar de nivel II de bioseguridad (Labconco®). Las células MDBK se cultivaron ya sea en platos para cultivo de células (Corning®) de 100x20 mm ó en frascos para cultivo de células (Corning®) de 75 ml. Las condiciones de incubación consistieron en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C en medio esencial mínimo (MEM)(DMEM/F12+GlutaMAX™-I) adicionado con 10% de SFB (Gibco®) (inactivado a 56°C durante 30 min.) y antibióticos (Penicilina 0.04g/l, estreptomicina 0.07g/l, y Anfotericina B 0.25g/l). La dilución celular de trabajo para el pasaje de las células fue de 1:10 (1ml de 10 de suspensión celular [1×10^7 /ml] en 9 ml del medio de cultivo listo para su uso); transcurrido 24 horas de haber realizado el pasaje se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo nuevo. El crecimiento celular fue observado diariamente durante 3-5 días.

3.4.3 Disgregación celular

La disgregación celular fue llevada a cabo mediante el uso de una mezcla de Tripsina al 0.05% y EDTA-4N en solución salina balanceada de Hank's (Gibco®). El proceso consistió en retirar el medio de cultivo del plato o frasco de cultivo e inmediatamente depositar 5 ml de la mezcla tripsina /EDTA. Se dejó incubando durante cerca de 2 min a 37°C, con observación constante hasta observar el efecto

característico de la acción de la tripsina. Trascurrido el tiempo y bajo previa observación de efecto se retiran con cuidado los 5 ml de la mezcla tripsina/EDTA. Enseguida se golpetea suavemente la caja de cultivo hasta desprender las células. Las células se resuspenden en 5 ml de MEM para su posterior conteo.

3.4.4 Conteo celular

El método de conteo celular se empleó para determinar el número de células que a su vez fueron utilizadas en la seroneutralización, titulación viral y congelación, además debido a que en el método se utiliza un colorante vital (azul tripán) se puede observar microscópicamente las células muertas y calcular el porcentaje de células muertas de un determinado cultivo.

El conteo se realizó con la ayuda de cámara de conteo (cámara de Fuchs-Rosenthal) almacenada en Etanol 70% (v/v). La cámara, previo a su uso, fue perfectamente secada y sobre la parte superior se colocó un cubreobjetos de tal forma que quede unida a la superficie de la cámara sobre la zona cuadrículada para el conteo.

La mezcla de la suspensión celular y la solución del azul tripán se homogenizaron muy bien con la ayuda de una micropipeta. Se tomaron de 20 a 50 μ l de la suspensión y se colocaron entre el espacio del cubreobjetos y la cámara, la acción se realizó con cuidado hasta que la suspensión logró alcanzar el extremo opuesto del cubreobjetos. Para la realización del conteo celular se dejó en reposo durante 1-2 min hasta lograr la sedimentación de las células.

El conteo celular se llevó a cabo bajo el microscopio óptico invertido a un aumento de 100x. El conteo se realizó en los 4 cuadrantes mayores en forma

diagonal (cuando la cámara tenga 16 cuadrantes). Se contaron todas las células vivas, es decir las células no teñidas de azul, morfológicamente intactas que se encontraban dentro del cuadrante a contar, así como las que se encontraban en la línea media izquierda y de abajo (Conteo en forma de L). En la figura 6 se muestran los cuadrantes a contar de la cámara y las líneas de conteo de cada cuadrante. Las células contadas en cada cuadrante se anotaron en el protocolo y finalmente se sumaron. Si se encuentran menos de 20 o más de 100 células por cuadrante se deberá repetir la dilución (mayor o menor dilución). Si existen más de un 10% de células dañadas se deberá repetir nuevamente la resuspensión celular y hacer nuevamente el conteo celular. El porcentaje de células dañadas (teñidas de azul) deberán estimarse y anotarse en el protocolo.

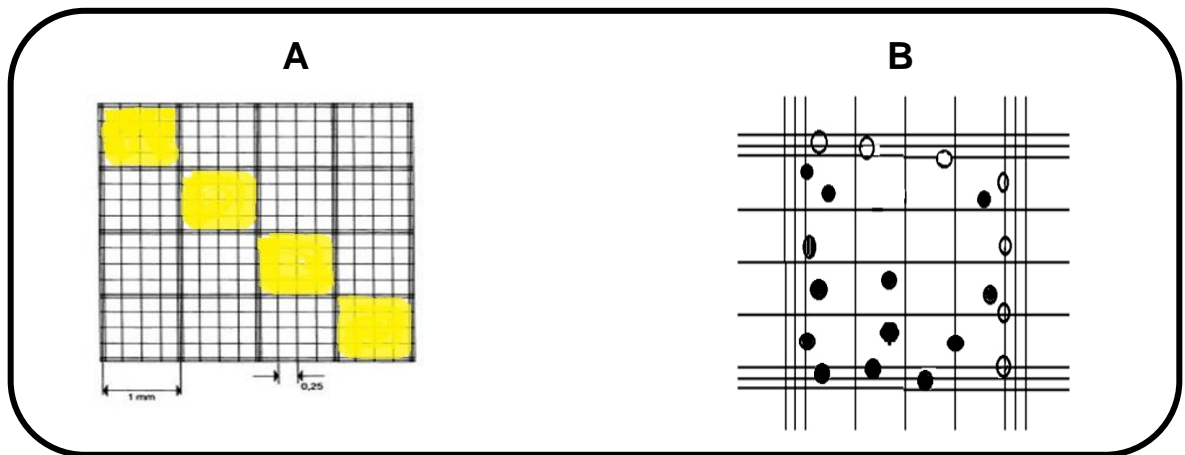


Figura 6. Conteo celular en cámara de Fuchs-Rosenthal.

- A) Los cuadros sombreados son los considerados para el conteo de células.
 B) Cuadro de la cámara de conteo. Las células (○) sobre las líneas superior y derecha no se contabilizan, Las células (●) ubicadas sobre las líneas izquierdas e inferiores se toman en cuenta para el cálculo (conteo en forma de "L") (M. König; 2010).

3.4.4.1 Cálculo del número de células

El volumen total que se puede colocar en una cámara de Fuchs-Rosenthal es de 3.2 μ l (4 mm x 4 mm x 0.2 mm). De ahí que se tiene que realizar el siguiente cálculo para determinar el número de células por mililitro:

$$n \times 4 \times V \times 1000/3.2 = \text{células / ml}$$

$$n \times V \times 1250 = \text{Células/ ml}$$

Donde: n= Células en los 4 cuadrantes
V= factor de dilución (i.d.R. 1:10)

3.5 Cepa control de BoHV-1

Para la realización del estudio se uso como referencia la cepa Cooper-1 [Colorado-1] del BoHV-1 (ATCC: VR864TM). Esta cepa fue aislada en 1955 a partir de un brote de enfermedad respiratoria (Rinotraqueitis) (York, C.J., et al., 1957). La cepa viral se mantuvo a -70° C y fue activada en células MDBK previo a la ejecución de cada protocolo.

3.6 Aislamiento viral en cultivo de células.

El aislamiento del BoHV-1 se realizo de acuerdo al protocolo establecido por la OIE con ligeras modificaciones (OIE., 2008). De las muestras de plasma seminal fresco o congelado se diluyeron 200 μ l en 2ml de SFB (Gibco®, Invitrogen®) inactivado, con antibióticos y libre de anticuerpos (anti-herpes) y virus.

La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó durante 30 minutos a temperatura de cuarto (22-25° C). Después se inocularon 200 μ l de la mezcla semensuero en una monocapa de células MDBK con 80% de confluencia en una placa de cultivo de tejidos de 24 pozos (Corning®). Para cada muestra se hicieron tres

repeticiones incluidos controles positivos y negativos. Se tuvo la precaución para evitar contaminaciones cruzadas durante el proceso. La monocapa celular se incubó durante una hora a 37.5° C, con una atmosfera húmeda, a 37°C y 5% de CO₂ en el medio ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se desecho el sobrenadante y enseguida la monocapa fue lavada 2 veces con MEM sin SFB y antibióticos. Finalmente se adicionaron 200 µl de “medio de mantenimiento” que se compone de medio MEM más 5% (v/v) de SFB y 1% (v/v) de la mezcla de antibiótico y antimicótico. Las monocapas celulares se observaron diariamente durante 3-5 días bajo microscopio óptico invertido con el fin de observar el efecto citopático (EC) característico del virus. El sobrenadante de los cultivos positivos con EC fue obtenido y congelado a -70°C hasta su uso posterior en el PCR, re-amplificación ó seroneutralización. Aquellas muestras que no presentaron EC hasta 5 días, fueron sometidas a 3 pasajes “ciegos” (100µl por pocillo) consecutivos, después de lo cual fueron consideradas negativas.

3.7 Titulación viral de la cepa control y de los aislados virales de campo

Este método se desarrollo bajo una campana de flujo laminar de nivel II de bioseguridad de características previamente descritas. Las titulaciones virales se realizaron en platos de cultivo de 96 pozos (Falcon™). Se colocaron 100 µl de medio de cultivo sin suero fetal por pozo. Se agregaron 25 µl del stock viral en la columna numero uno por ocho repeticiones y se realizó una dilución quíntuple seriada. Después de esto se colocó una suspensión celular de 100 µl (2.5×10^5 MDBK-células /ml en medio de cultivo con 10% de SFB) por pozo. Los platos se incubaron durante 72 horas con 5% CO₂ a 37.5°C, como se señalo previamente. Los

resultados de la titulación se observan mediante por el reconocimiento de placas líticas en las células de cultivo. El cálculo de la Dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos (TCID₅₀) se realizó empleando la formula de Spaermann y Kärber (Thrusfield, M., 2007): $\log ED_{50} = L - d(\Sigma P - 0.5)$

Donde:

L= logaritmo de la dilución más alta en el cuál ocurra daño citopático

d= diferencia entre el logaritmo del factor de dilución

ΣP = sumatoria de la proporción pozos “positivos” (que muestran efecto citopático).

3.8 Ensayo de Seroneutralización viral

Esta prueba serológica se basa en la detección cuantitativa de anticuerpos neutralizantes frente al BoHV-1 utilizando células indicadoras y una cepa viral de referencia con título previamente conocido. El procedimiento se basó en el protocolo DL-AV-044/1/SNT, establecido en el laboratorio de Diagnostico del Instituto de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Giessen (König, M., 2010). Este incluyó la desnaturalización inicial de los sueros problema y controles a 56°C durante 30 minutos. Enseguida, en una placa de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular (Corning®,) se colocaron 150µl del medio de cultivo en los pozos H1 y H2 y en el resto de los pozos de la placa se colocaron sólo 100µl del medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta multicanal; a continuación se depositaron en los pozos A3 y B3 50µl del suero control positivo (CP) anti-BoHV-1 y en los pozos A4 y B4 50µl de suero control negativo (CN). Los sueros de los pocillos B3 y B4 se diluyeron 1:3 seriadamente como a continuación se describe. Se tomo la precaución de mezclar con cuidado el contenido de los pozos del B3 y B4 con

puntillas estériles de 100µl mediante un “pipeteo” mínimo de 8 veces, enseguida se tomaron 50µl del contenido de cada de estos pozos y se depositaron en los pocillos de la línea C siguiente (pocillos C3 y C4). De estos últimos pocillos se repitió la operación hacia la fila D (pocillos D3 y D4) y así sucesivamente hasta los pocillos de la fila H3 y H4. Al final se desecharon 50µl de la última línea de pozos con volumen final de 100 µl. Los pozos A3 y A4 fueron usados como controles de toxicidad de los sueros controles en la monocapa de células. Los sueros de prueba o problema se depositan por duplicado a razón de 50 µl por pocillo. Desde el pocillo A5 (suero problema 1) hasta el A12 (suero problema 8) cada suero fue depositado en el pocillo respectivo para medir evidencia de toxicidad en la monocapa celular. En los pocillos B5 hasta B12 se depositaron y mezclaron, con ayuda de una pipeta multicanal (200µl), por lo menos 8 veces, cada uno de los sueros problema. A partir de esta línea se realiza la dilución 1:3 del suero problema en las líneas sucesivas. Después de la mezcla se obtienen 50µl de la dilución y se transfieren hacia el pocillo de la línea siguiente. La operación se repite sucesivamente desde la fila B hasta la H con cada pocillo respectivo. Al final en la línea H se desecharon 50µl de cada pocillo para obtener un volumen final de 100 µl. La cepa viral del BoHV-1 se empleó a una dilución de 1:10 con medio de cultivo con un ajuste final de 100 TCID₅₀. Se colocaron 50µl de la dilución en los pozos de la columna 3 a partir de la fila B (B3) y hasta la fila H (H3). Por otro lado en las columnas 1 y 2, comenzando en la fila A (A1 y A2), se realizó la dilución doble seriada de la suspensión viral hasta la fila G (G1 y G2). A los pocillos H1 y H2 solo se les agregó células como sistema indicador. La placa con los sueros y la cepa viral se incubaron durante una hora a 37°C en la incubadora de CO₂. Transcurrido el tiempo se depositaron 2,5 X 10⁵ células en cada uno de los 96

pocillos sin tocar estos con las puntillas. La placa se vuelve a incubar durante 72 horas con revisiones diarias para observar el efecto citopático. Las muestras se considera positiva a anticuerpos cuando en la primera dilución del suero de prueba no hay evidencia de efecto citopático. Para obtener el valor de la dilución de anticuerpos neutralizantes en una muestra determinada se empleó la fórmula de Spaerman y Kärber como fue señalado previamente en 3.5.1.

3.9 Producción de antisueros anti-BoHV-1 en caprinos

La producción del suero policlonal anti-BoHV-1 fue realizada siguiendo y adaptando el protocolo descrito por Avalos-Ramírez, para la producción de antisueros contra pestivirus (Avalos, R.R., 2002). Para la producción de antisueros anti-BoHV-1, se usaron 2 caprinos hembra de 4-5 meses de edad. Los animales fueron obtenidos del hato caprino de la FMVZ de la UANL mantenido en General Bravo, N.L. Antes de realizar las infecciones, los animales fueron inspeccionados clínicamente y mantenidos en cuarentena en jaulas metabólicas (2 semanas) en un cuarto de aislamiento. Durante este tiempo en los 2 ejemplares se determinó la ausencia tanto de anticuerpos anti-BoHV-1 y anti-pestivirus (seroneutralización) como de virus (aislamiento en células MDBK). Para la infección, el suero de cada animal fue usado para adaptar células MDBK, lo cual se realizó reemplazando el SFB con el respectivo suero de cada caprino. Las células MDBK adaptadas en su respectivo suero (5% suero caprino y durante 3-4 pasajes) fueron inoculadas con 250µl de una suspensión viral de la cepa Cooper del BoHV-1 con una concentración de 1×10^6 TCID_{50%}/ml El procedimiento de la infección de la monocapa celular se

realizó conforme se señala en el apartado 3.6. Después de 72 horas de incubación se obtuvo el sobrenadante y a partir de este se determinó la concentración de virus como se señala en el apartado 3.7. La infección de las cabrillas fue realizada como describe en el cuadro 1. Después de la inoculación se determinó la temperatura rectal diariamente durante 10 días y se obtuvo sangre venosa a intervalos irregulares de 2-6 días durante 48 días. El suero obtenido mediante centrifugación fue analizado para determinar el título de anticuerpos neutralización frente a la cepa Cooper del BoHV-1.

Cuadro1

Concentración viral, dosis y ruta de inoculación en caprinos para la obtención de suero policlonal anti-BoHV-1

Animal	Concentración viral TCID _{50%} /ml	Cantidad inoculada / Ruta
200	1×10^7	10 / Intravenoso (3 ml) Intranasal (3 ml, 1.5 ml /fosa nasal) Intravaginal (4 ml)
964	1×10^6	10 / Intravenoso (3 ml) Intranasal (4 ml, 2ml/fosa nasal) Intramuscular (3 ml)

Fue seleccionado el suero de la cabra 200 a los 34 post-inoculación debido a que presentaba un título de 1:81 en la seroneutralización frente a la cepa homóloga control del BoHV-1. Este suero policlonal de forma directa fue usado en la inmunofluorescencia indirecta y en la seroneutralización para la identificación serológica de los aislados de campo.

3.10 Inmunofluorescencia Indirecta

La identificación serológica de las cepas aisladas a partir del fluido seminal fue llevada a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta con el uso de antisuero policlonal anti-BoHV-1 (cepa Cooper) producido en cabras como se señala en 3.8.

Después de infectar las células como se señala en el apartado 3.6 el sobrenadante del cultivo fue retirado mediante succión con micropipeta y almacenado hasta su uso en el PCR. Enseguida, la monocapa celular fue lavada dos veces con PBS y fijada con Paraformaldehído (PFA) al 2% (200 µl por pozo) 20 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo se retiró el PFA y la monocapa fue lavada de nuevo con PBS durante 2 veces. La monocapa celular fue expuesta a una dilución de 1:10 del suero policlonal anti-BoHV-1 (ver apartado 3.8) en buffer ABDB-A e incubada a 37°C durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente las monocapas celulares de cada pozo fueron lavadas con PBS durante 3 veces. La inmunodetección se realizó mediante la adición del anticuerpo monoclonal anti IgG caprina producida en ratón marcado con Cy3 (www.jacksonimmuno.com) a una dilución de 1:500 en buffer ABDB-A e incubada a 37°C durante una hora. La lectura se realizó bajo un microscopio de fluorescencia a 552nm previo lavado de cada uno de los pocillos en la placa con PBS 3 veces. Las muestras en las cuales se observaron emisión de fluorescencia a nivel celular individual o grupal fueron registradas como positivas. Las muestras en las que sólo se observó un campo oscuro fueron registradas como negativas a la presencia del virus. La preparación del buffer y los lineamientos generales de la inmunofluorescencia se realizó acorde a lo descrito por Avalos, R. R. (Avalos, R.R., 2002) y Cedillo, R.S. (Cedillo, R.S., 2004).

3.11 Detección molecular del BoHV-1

La detección molecular del BoHV-1 se realizó a partir del fluido seminal (3.3.2.) y de las muestras que mostraron evidencia de daño citopático en cultivo de células (3.6.).

3.11.1 Extracción de ADN de semen

Para extraer el DNA total partir de semen bovino, se usaron 200 µl de semen completo a los cuales se les adicionó 50 µl de lisozima de una concentración de 10 mg/ml. La mezcla se incubó a 37° C durante una hora, agitando de vez en cuando. Posteriormente se agregaron 75 µl de SDS (Lauril Sulfato de Sodio) al 10% y 5–10% de Proteinasa K (10 mg/ml), se agitó e incubó 10 minutos a 65° C. Después de este tiempo, se agregaron 100 µl de NaCl 5M, se agitó suavemente y se le adicionó a la mezcla 100 µl de CETAB al 2%/v, previamente calentado a 65° C. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos en agua hirviendo para inactivar enzimas. Enseguida se le adicionó a la mezcla 750 µl de SEVAG (Cloroformo:Isoamilico; 24:1), y se agitó para homogenizar. Después la mezcla fue centrifugada a 9,800 g x por 10 minutos. El sobrenadante (entre 500 y 600µl) fue transferido a un tubo nuevo procurando no succionar la fase intermedia. Al sobrenadante se le añadieron 0.6 volúmenes de Isopropanol y se incubó a -20° C durante 30 minutos. Posteriormente los tubos fueron sujetos a centrifugación a 9,800 g x por 15 minutos y lavado con etanol frío. Se descartó la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20 µl sobre el ADN precipitado. A este se le añadió 1 ml de Etanol absoluto frío (mantenido a -20° C) y se centrifugó a 9,800 g x por 5 minutos. Se descartó la mayor parte del sobrenadante teniendo precaución de no perder el botón durante el decantado.

Finalmente, el DNA fue disuelto con 20 μ l de buffer TE 1X pH 8 y almacenado a -20° C hasta su uso.

3.11.2 Extracción de ADN a partir de sobrenadante de cultivo de células

La obtención de ADN, a partir de todos los sobrenadantes de las muestras procesadas como se señala en el apartado 3.6, fue realizada con el uso del estuche “AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit” (www.axygenbio.com) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve, se mezclaron vigorosamente 200 μ l del sobrenadante del cultivo de células y 200 μ l del buffer V-L en un tubo de plástico para microcentrifuga de 1.5 ml. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 22-25°C, se le agregó 75 μ l del buffer V-N y se agitó para homogenizar. El tubo fue centrifugado a 12,000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo de 2 ml y se mezcló con 250 μ l de una solución de Isopropanol y 1% de ácido acético. La mezcla fue agitada y posteriormente depositada en una columna de sílica. La columna colocada sobre un tubo para microcentrifuga de 2 ml fue centrifugada a 6,000xg durante 1 minuto. El eluido (filtrado) fue descartado, la columna fue colocada de nuevo en el tubo de 2 ml y lavada con 500 μ l del buffer W1 y 800 μ l del buffer W2. Entre cada lavada la columna y el tubo fueron centrifugados a 12,000xg durante 1 minuto. Finalmente, la columna fue transferida a un tubo de 1.5 ml y el ADN fue eluido con 45 μ l de buffer TE, previa incubación a temperatura de cuarto y centrifugación a 12,000xg durante 1 minuto.

3.11.3 Iniciadores

Los iniciadores utilizados en el PCR y PCR de gradientes fueron los reportados por Abril y colaboradores (Abril C. et al.; 2004). Los iniciadores amplifican un fragmento de 97 pb dentro del marco de lectura del gen de la glucoproteína B del BoHV-1. Las secuencias de bases son como siguen: gBF (5'-TGTGGACCTAACCTCACGGT-3') y el gBR (5'-GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC-3'). Como control interno de la extracción del ADN y del proceso de PCR se incluyeron los iniciadores PRL33 (5'-CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT-3') y PRL35 (5'-GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTC-3') ambos iniciadores amplifican un fragmento de 156 bp del exón 3 del gen de la prolactina bovina (Lewin, H.A., et al., 1992; Mirsky, M.L., et al., 1993). Un juego de iniciadores adicionales fue usado para aquellas muestras de sobrenadantes de cultivos de células que salieron positivas para la amplificación del fragmento de la glucoproteína B del BoHV-1. Los iniciadores adicionales usados amplifican un fragmento de 122 bp del gen glucoproteína C del BoHV-1 y su secuencia es gC-up 5'-ATGTTAGCGCTCTGGAACC-3' y gC-down 5'-CTTTACGGTCGACGACTCC-3' (Lovato, L., et al., 2003). Todos los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MWG-Biotech (MWG-Biotech, Inc. High Point, NC, USA).

3.11.4 PCR de gradientes

Previo al análisis mediante PCR de las muestras de plasma seminal y de los sobrenadantes (aislados virales) que produjeron efecto citopático en células MDBK, se realizó la determinación de la temperatura de unión de los iniciadores gBF y gBR mediante PCR de gradientes. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador

(MaxyGen) de gradientes con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C 4 min → desnaturalización 94°C 1 min → unión de iniciadores [48.1, 50.2, 51.8, 54.6, 56.3, 58.1 y 60.1]°C 30 seg. → Extensión 72°C 30 seg [35 ciclos] → 72°C 5 min. → 4°C durante 9hrs.

Con excepción de la temperatura de unión de iniciadores, el contenido de la mezcla y las condiciones del PCR fue igual a lo establecido en el protocolo descrito abajo (3.10.3.). Bajo las condiciones descritas se observaron amplificaciones en el rango de temperatura de 51.8 a 58.1°C, empero el tamaño de banda esperado que mostró mayor nitidez fue a 56.3°C. Fue seleccionada la temperatura de 56°C de unión de iniciadores para las subsecuentes reacciones de PCR.

3.11.5 Programa en el termociclador

El programa de termociclador consistió en: una desnaturalización inicial de 95°C por 20 segundos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y por último una extensión final de 7 minutos a 72°C. En cada reacción se incluyeron como control positivo a la cepa Colorado y como control negativo agua para PCR.

3.11.6 Protocolo del PCR

Este procedimiento fue realizado con la ayuda del estuche comercial “Platinum® PCR Super Mix” (Invitrogen®, cat. No.875132). El protocolo consistió en un volumen total de 60 µl que incluía 45 µl de una mezcla que contenía 22U/ml *Taq*

DNA polimerasa recombinante, 22mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP y “estabilizadores” / ml mas 3 μl del iniciador gBF [10pmol/ μl], 3 μl de iniciador gBR [10pmol/ μl], 3 μl de iniciador PRL33 [10pmol/ μl], 3 μl de iniciador PRL35 [10pmol/ μl] y 3 μl de DNA extraído. El protocolo para la amplificación del fragmento de 122 bp del gen de la Glucoproteina C del BoHV-1 fue bajo las mismas condiciones pero solo se usaron los iniciadores gC-up y gC-down en un volumen de reacción de 50μl según indica el estuche comercial.

3.11.7 Electroforesis y visualización de amplicones

La verificación se realizó en geles de agarosa al 2 %. El tamaño de banda esperado del amplicón con los iniciadores gBF y gBR fue de 97 bp. El producto de 122 bp generado con el uso de los iniciadores gC-up y gC-down fue evidenciado en geles de poliacrilamida al 9%. La preparación de estos geles y el protocolo de corrimiento electroforético se realizó como se describe en (Avalos, R.R., 2002 y Domínguez, D.D., 2009).

4 Resultados

4.1 Hatos, raza, edad y procedencia de los positivos al BoHV-1

La proporción de sementales infectados, así como el tamaño del hato y procedencia de los ranchos analizados se muestra en el cuadro 2. El rango de bovinos por hato fue de 110 – 230 y en promedio 168.2 animales por rancho. Un total de 11 hatos procedieron de Gral. Bravo N.L. y solo un hato de los municipios de China N.L., Dr. González N.L., Vallecillo N.L. y Mier Tamaulipas.

Cuadro 2.

Ubicación de los hatos y proporción de sementales infectados

Hato	Procedencia	Animales por hato	Sementales muestreados	Positivos
1	China, N.L.	200	3	0
2	Dr. González, N.L.	187	3	0
3	Gral. Bravo, N.L.	160	5	2
4		155	3	0
5		203	4	0
6		133	3	0
7		110	4	0
8		188	3	0
9		225	5	0
10		168	4	0
11		230	4	0
12		155	7	2
13		120	3	0
14	Mier, Tamps.	112	11	0
15	Vallecillo, N.L.	177	3	0
		168.2	65	4

El total de sementales muestreado fue de 65 de los cuales 45 procedían del municipio de Gral. Bravo N.L., 11 de Mier Tamaulipas y solo 3 de cada uno de los municipios de China, Dr. González y Vallecillo Nuevo León (Cuadro 1). Acorde al criterio empleado, del total de hatos estudiados el 13.3% (2/15) resultó cuando menos con un semental infectado. Las razas de animales que resultaron positivos al aislamiento en cultivo de células y posterior confirmación mediante PCR fueron 2 de la raza Charolais y 2 de la raza Beefmaster (Cuadro 2) ambos ranchos se ubican en el Municipio de General Bravo, N.L. La proporción de sementales positivos del total muestreado fue de 40% (2/5) para el hato No. 3 y de 28.6% (2/7) para el hato 12 (Cuadro 1). La edad de los sementales infectados estuvo en un rango de 27 a 68 meses, pero solamente uno de los animales, al momento del muestreo, tenía 68 meses de edad para el resto el promedio de edad fue de 28 meses (rango 27-29) (Cuadro 2).

4.2 Aislamiento Viral

Todas las muestras de semen fueron procesadas para aislar al BoHV-1. Acorde al protocolo empleado, es factible aislar otras entidades virales por lo que, además de analizar la presencia de BoHV-1 también se busco evidencia de la presencia de Pestivirus. Ninguna de las muestras mostró evidencia de presencia de pestivirus (cepas citopáticas y no citopáticas) después de someter el sobrenadante de los cultivos de MDBK inoculados a RT-PCR mediante el procedimiento reportado por Avalos, 2002 y Domínguez, 2009 (Datos no mostrados). Del total de las 65

muestras de semen analizadas para aislamiento del BoHV-1, el 6.2% (4/65) de resultaron positivas. La muestra 1 correspondió a un Charolais de 68 meses, la muestra 2 a un Charolais de 29 meses, la muestra 3 a un Beefmaster de 27 meses y la muestra 4 a un Beefmaster de 28 meses. Fue necesario para todos los aislados como mínimo dos pasajes “ciegos” para evidenciar el efecto citopático característico de BoHV-1 (Alfaherpesvirus) en las células MDBK. Para las muestras 1 y 3, obtenida de ejemplares de distintas razas y ranchos, fue necesario realizar 3 pasajes para evidenciar el efecto citopático. Para las muestras 2 y 4 el efecto citopático fue evidente en el segundo pasaje “ciego”, los ejemplares afectados son de distintos ranchos y razas (Ver cuadro 2).

Cuadro 3

Relación entre la edad y raza de los sementales positivos al BoHV-1 con la cantidad de pasajes en cultivo de células

Semental⁽¹⁾	Hato⁽²⁾	Raza	Edad⁽³⁾	Pasajes⁽⁴⁾
1	3	Charolais	68	3
2			29	2
3	12	Beefmaster	27	3
4			28	2

(1) Numeración acorde se realizó el aislamiento de forma consecutiva

(2) Hato de procedencia acorde a los datos del cuadro 1

(3) Edad en meses

(4) Numero de pasajes necesarios en células MDBK para evidenciar efecto citopático y posterior confirmación con PCR.

El efecto citopático de los aislados fue muy similar al observado para la cepa control. De manera paralela se inocularon células con plasma seminal sin diluir, el efecto del plasma sobre las MDBK fue distinto al observado en aquellas muestras de plasma seminal diluido (ver figura 8). En la figura 7 se muestra un campo de las

células MDBK sin inocular (control no infectado), mientras que en la figura 8 se muestra el efecto sobre las células del plasma seminal sin diluir y en las figuras 9 y 10 se muestra el efecto citopático causado por la cepa BoHV-1 Cooper de referencia y por uno de los aislados (toro 2, hato 3), respectivamente.

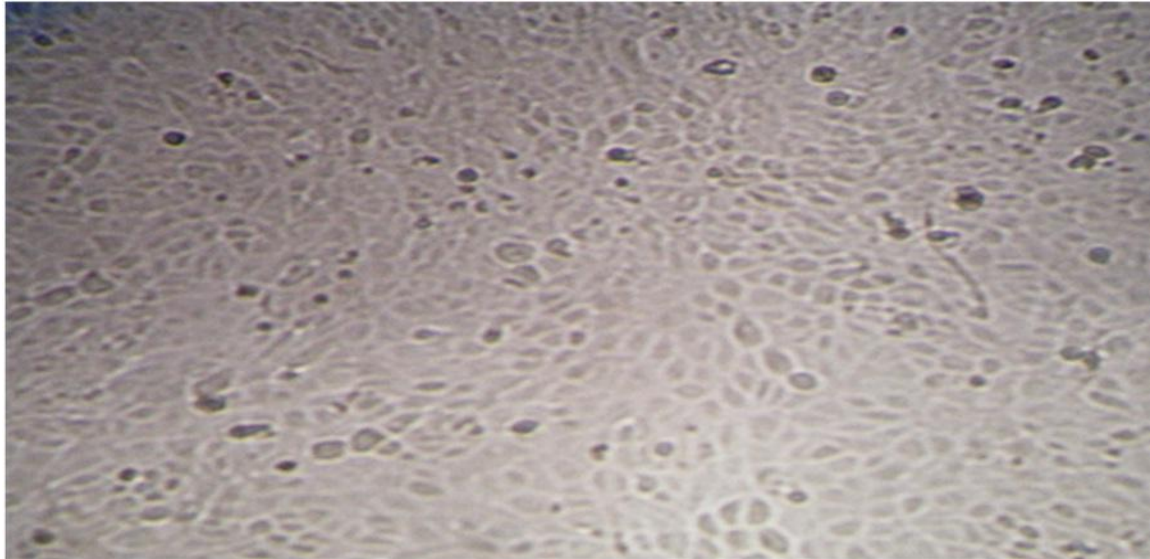


Figura 7. Células MDBK control sin inocular al 100% de confluencia

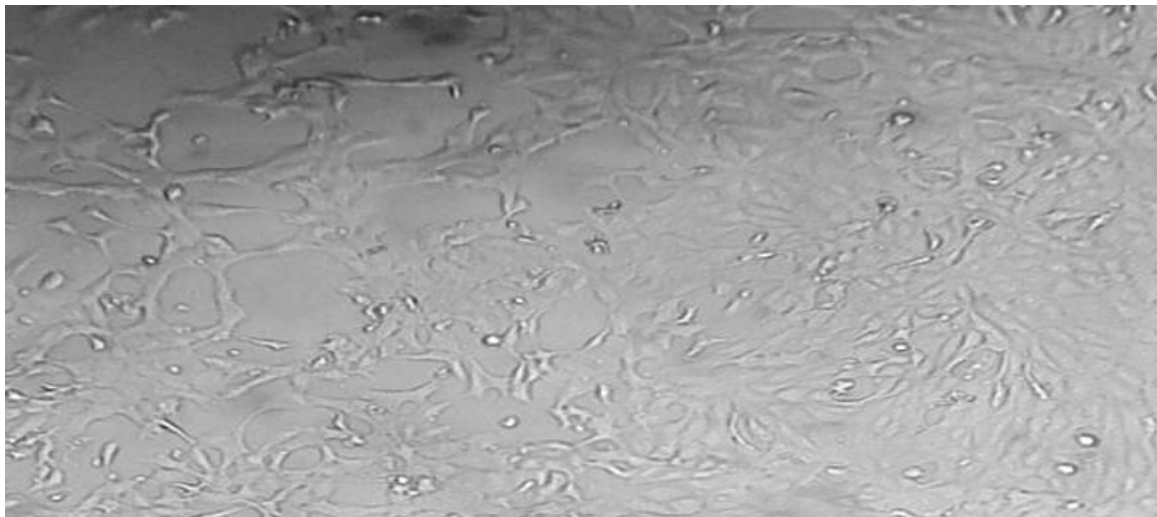


Figura 8. Monocapa de células MDBK inoculadas con plasma seminal de bovino sin diluir, efecto a las 8 hrs post-inoculación.

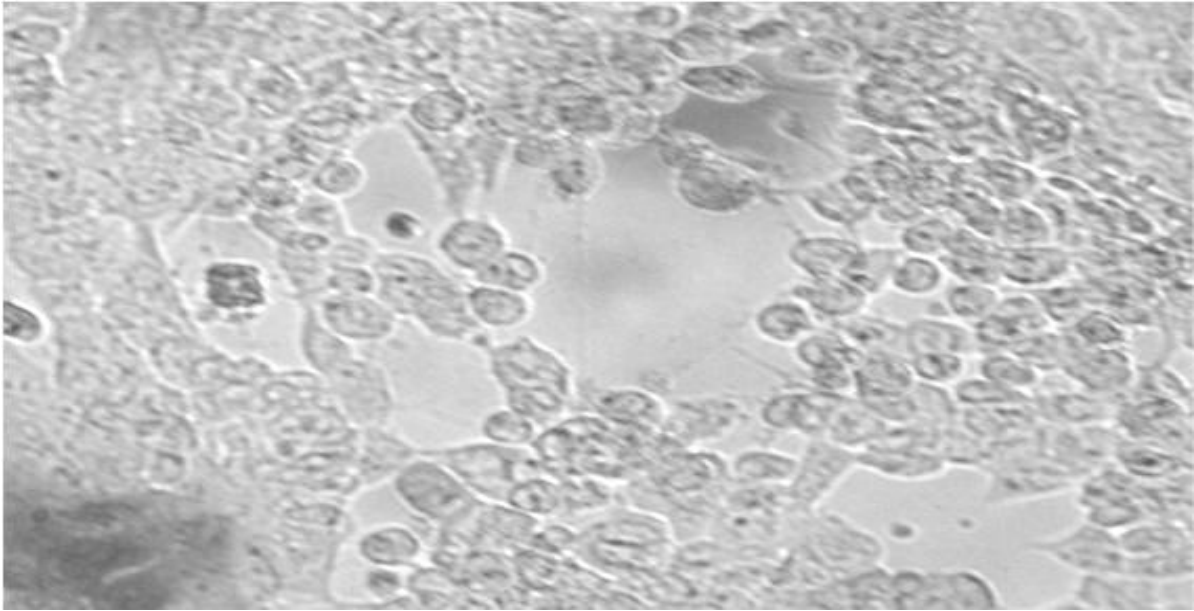


Figura 9. Efecto citopático (24-72 hrs) producido por la cepa de referencia Cooper del BoHV-1 en la monocapa de células MDBK.

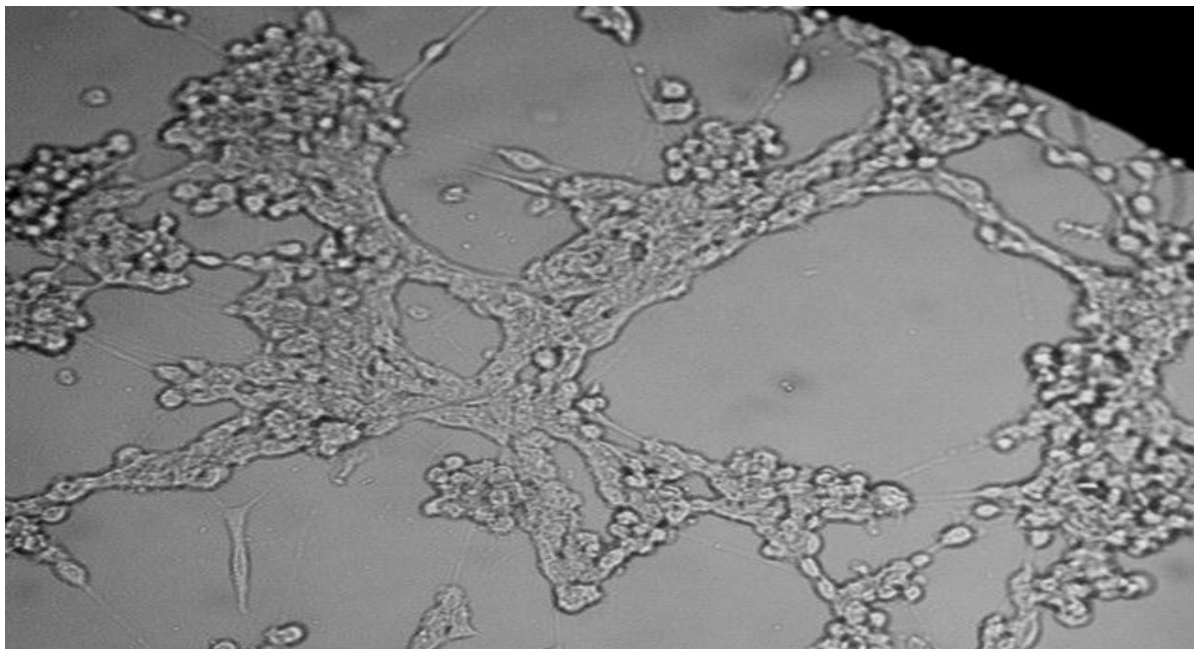


Figura 10. Efecto citopático producido por una de las cepas aisladas.
El aislado corresponde con el toro Charolais 2 del hato 3 el efecto se observó las 36 hrs en el segundo pasaje.

4.3 Identificación serológica mediante seroneutralización

Las cepas aisladas fueron confrontadas contra el suero policlonal caprino anti-BoHV-1 producido contra la cepa de referencia Cooper (Colorado). Diluciones decrecientes al triple seriado del suero caprino fueron confrontadas contra 100 TCID_{50%} de los virus aislados así como la cepa homóloga de referencia. En el cuadro 3 se muestran los resultados de la seroneutralización. El título, recíproco de la dilución, necesario para proteger al 50% de la población celular de la cepa control homóloga fue de 1:81, como ocurrió durante la selección de este suero (ver 3.8 de Materiales y métodos). Para los cuatro aislados se observaron variaciones en los títulos de seroneutralización de 1:9 a 1:81. El aislado 2 (semental 2, hato 3) mostró un título similar al de la cepa de referencia, mientras que, interesantemente, el aislado 1 (semental 1 del hato 3) el título de seroneutralización fue de 1:9. Ambos aislados procedieron del mismo hato. Los aislados 3 y 4 (toros 3 y 4 del hato 12) mostraron ambos títulos de seroneutralización de 1:27.

Cuadro 4

Relación antigénica entre la cepa control del BoHV-1 y las cepas aisladas

Cepa	Título de Seroneutralización *
Colorado-1 [Cooper-1] (Control)	1:81
Aislado 1	1:9
Aislado 2	1:81
Aislado 3	1:27
Aislado 4	1:27

(*)Título de anticuerpos usando un suero control producido en cabra específico contra la cepa Colorado.

Con estos resultados se muestra evidencia de variaciones antigénicas entre la cepa control y 3 de los 4 aislados (Cuadro 2). Además de esto, aparentemente dentro de un mismo hato es posible que concurren dos cepas antigénicamente distintas como ocurrió en el rancho 3 con los aislados 1 y 2.

4.4 Identificación serológica mediante Inmunofluorescencia Indirecta

Cultivos celulares infectados con los aislados y la cepa control fueron sometidos a inmunofluorescencia indirecta. En los 4 aislados se observó reacción positiva pero con distintas variaciones de intensidad. La cepa homologa (Cooper) así como el aislado 2 mostraron la mayor intensidad de emisión fluorescente. En el resto de los aislados la intensidad fue menor. En figura 11 se muestra las reacciones observados para la cepa control (A), el aislado 1 (hato 3) y el control negativo para aislamiento.

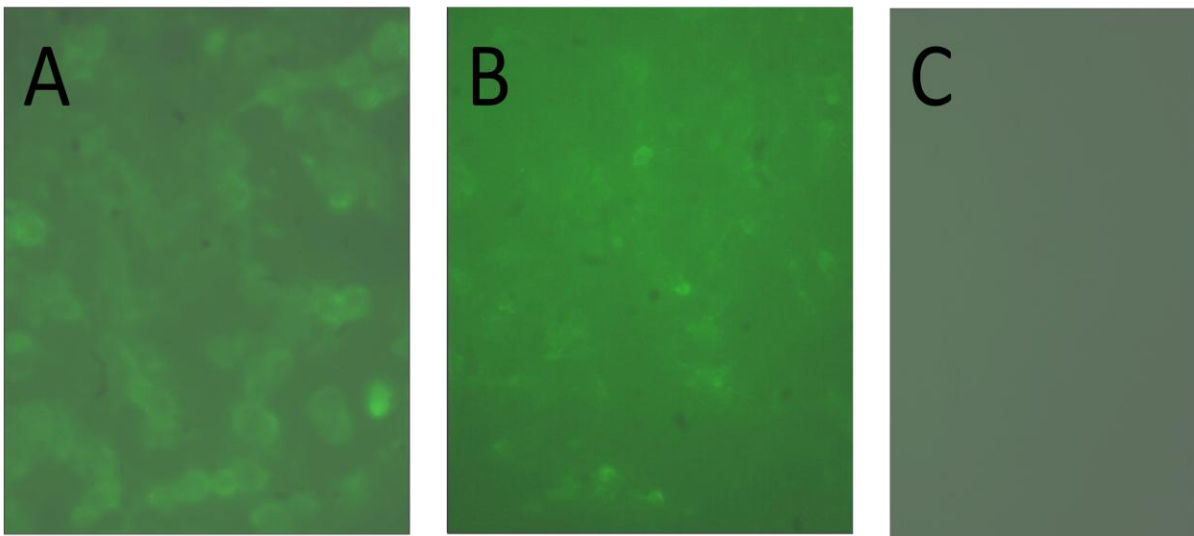


Figura 11. Inmunofluorescencia indirecta para la identificación serológica del BoHV-1. A) Reacción observada contra la cepa Cooper (colorado) usada como control positivo y contra la cual se elaboró el antisuero. B). Reacción observada contra el aislado 1 (hato 3, ver cuadro 3). C) Control negativo.

4.5 Detección y diferenciación molecular del BoHV-1 mediante PCR

Este procedimiento se usó para detectar secuencias del BoHV-1 tanto el plasma seminal sin diluir como para los sobrenadantes de cultivos de células que mostraron efecto citopático. Los iniciadores empleados son específicos del BoHV-1 y amplifican por separado fragmentos de los genes de las glucoproteínas B (Abril, C., et al., 2004) y C (Lovato, L., et al., 2003) del virus (ver 3.10.3).

Todas las 65 muestras de plasma seminal resultaron negativas a amplificación con la metodología empleada. Los sobrenadantes de cultivo de células de cada uno de los 4 aislados resultaron positivos para la amplificación de un fragmento de los genes B y C del BoHV-1. En la figura 12 se muestra el corrimiento electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR. Para cada aislado se observaron distintos niveles de intensidad con respecto a la cepa control.

La amplificación del gen de la prolactina, usado como control interno para la extracción de ADN y del PCR, resultó negativa para todos los sobrenadantes de células infectadas, el control positivo de BoHV-1 y para la mayoría (75%) de las muestras de plasma seminal bovino.

Como evidencia adicional de la identificación de los aislados como cepas de BoHV-1, se logró la amplificación de un fragmento del gen de la glucoproteína C (Lovato, L., et al., 2003). En la figura 13 se muestra el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida del producto de PCR de 122 bp de todos los aislados y de la cepa de BoHV-1 usada como control positivo.

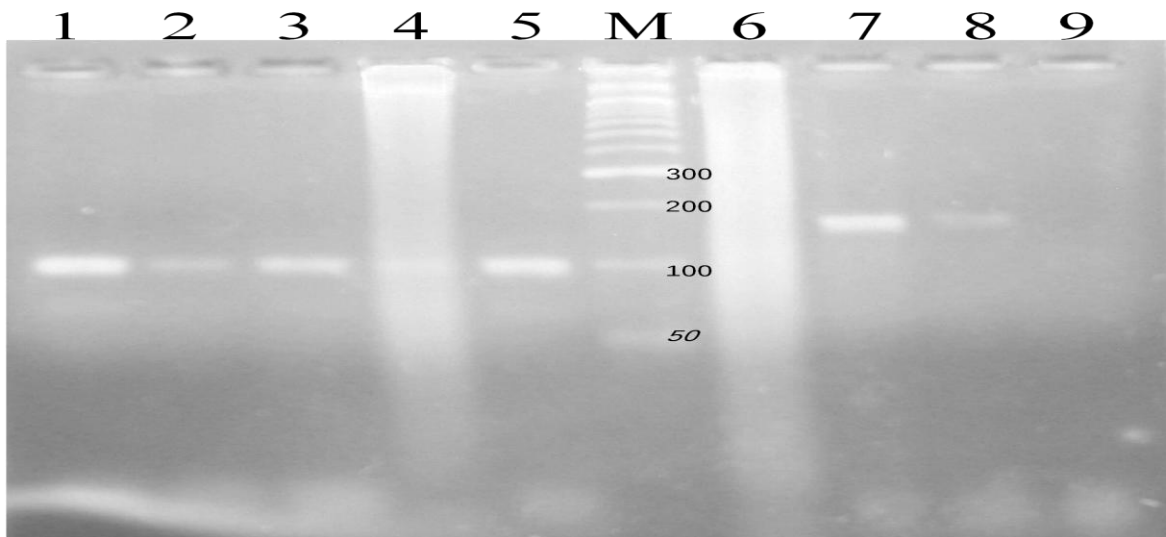


Figura 12. Amplificación de un fragmento de 97 pb del gen de la glucoproteína B del BoHV-1. Gel de agarosa al 2%. Carriles 1-4 sobrenadantes que corresponden a los aislados 1, 2, 3, 4, respectivamente (cuadro 2 y 3). Carril 5 control positivo, sobrenadante de células MDBK infectados con la cepa Cooper (colorado) del BoHV-1. Carriles 6-9 muestras de plasma seminal de los sementales 1-4 (Cuadro 2) positivos al aislamiento. M: Marcador de peso molecular.

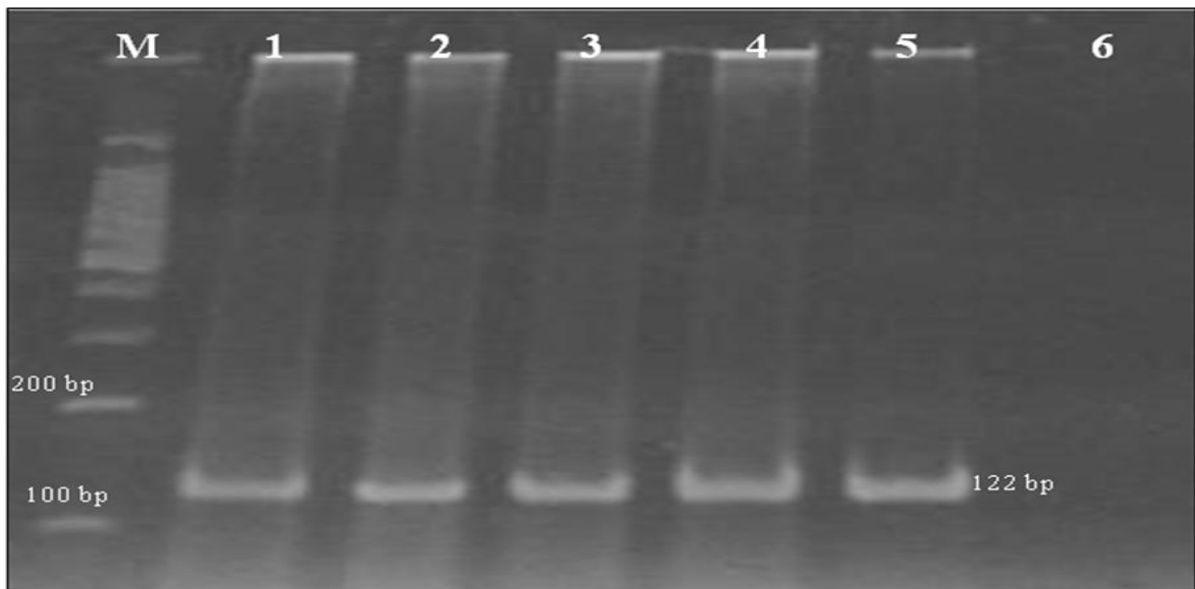


Figura 13. Amplificación de un fragmento del gen de la glucoproteína C del BoHV-1. Gel de poliacrilamida al 10% con productos de PCR obtenidas de los sobrenadantes de células MDBK infectadas con plasma seminal de distintos sementales (Cuadro 2). Carriles 1-4 muestras de sobrenadantes que corresponden a los aislados 1, 2, 3, 4, respectivamente (Cuadros 2 y 3). Carril 5 control positivo, sobrenadante de células MDBK infectados con la cepa Cooper (colorado) del BoHV-1. Carril 6 control negativo (agua) de reacción. M: marcador de peso molecular.

5. Discusión

El Herpesvirus Bovino-1 (BoHV-1) es uno de los virus de mayor distribución en la población bovina (Ackermann, M; Engels, M., 2006). Los estudios seroepidemiológicos muestran que, en aquellas regiones carentes de programas de control o con fallas en la bioseguridad, más del 80% de los hatos son seropositivos (Carbonero, A., et al., 2011; Domínguez, D.D., 2009; Woodbine, K.A., et al., 2009) y eventualmente pueden aparecer en brotes severos de enfermedad aguda (Blickenstorfer, S., et al., 2010). Una cifra similar fue recientemente obtenida para hatos del sistema vaca-cría del noreste de México, en un estudio para determinar los factores de riesgo del BoHV-1 y otros patógenos que afectan a la reproducción (Domínguez, D.D., 2009). Lo anterior, nos señala que el BoHV1 está ampliamente difundido en la referida área y que es necesario determinar el impacto del virus en la producción bovina.

Una parte fundamental de la alta seropositividad y distribución de la infección residen en los mecanismos de patogenicidad y especialmente el fenómeno de la inducción de latencia (Jones, C., 2003; Muylkens, B., et al., 2007). El BoHV-1 puede permanecer en estado latente en el bovino después de una infección primaria con cepas silvestres o cepas vacunales atenuadas (Nandi, S., et al., 2009). La habilidad del BoHV-1 para reactivarse a partir del estado latente es la responsable para la aparición de signos y síntomas de la enfermedad, de la excreción y de la propia transmisión del virus (Van Oirschot, J.T., 1995; Jones, C., 2003; Muylkens, B., et al., 2007). En el presente estudio, no se tomó en cuenta el estatus de la serológico del

hato o del semental frente al BoHV-1 pues cada hato fue considerado como seropositivo, acorde a un estudio previo (Domínguez, D.D., 2009). Una proporción menor al 7% de los sementales analizados resultó positiva a aislamiento del virus en el plasma seminal. Esta cifra, aparentemente baja, puede ser de significancia mayor, pues indica que el virus no solamente se excreta en animales aparentemente sanos sino que también bajo condiciones de campo en determinado momento de difícil precisión el virus puede infectar de forma intermitente a bovinos susceptibles. Esta observación concuerda a lo reportado por Lata (Lata, J., 2006) quien determinó la presencia del BoHV-1 en el semen de toros seropositivos y seronegativos al virus. Resultaría interesante, analizar si muestreos sucesivos en los sementales que resultaron negativos pudieran arrojar resultados positivos con estímulos naturales ó el uso de corticosteroides (Sheffy, B.E; Davies, D.H., 1972; Thiry, E., et al., 1987). Esto nos permitiría determinar si los animales son portadores del virus o no. Esto se enfatiza dado que, un estudio reciente en Europa determinó que un brote de abortos estuvo asociado al movimiento de bovinos y semen sin conocer su estatus frente al BoHV-1 (Blickenstorfer, S., et al., 2010). Por otro lado, también es necesario saber la cantidad de virus infeccioso que se excreta bajo condiciones naturales. Estudios previos ha estimado que se necesitan cerca de 3.2 TCID_{50%} del virus para lograr la infección ya sea intravaginal o intranasal (Van Oirschot, J.T., 1995). Así que los sementales portadores, independientemente de su estatus serológico, son una fuente potencial de diseminación del virus, por lo que es necesaria su detección (Van Oirschot, J.T., 1995; Van Engelenburg, F.A.C., et al., 1995) y remoción de la población.

El diagnóstico de la infección (determinación del estado de latencia) del BoHV-1 bajo condiciones de campo es difícil de llevarla a cabo (Lata, J., 2006; OIE., 2008). Esto ocurre debido a que la mayoría de las infecciones por BoHV-1 son sub-clínicas y que la excreción y re-excreción del virus está influenciado por el estado inmunológico del hospedador y a las propiedades (variaciones) genéticas y fenotípicas entre las cepas (Muylkens, B., et al., 2006, 2007). En el presente estudio, los análisis de PCR a partir de plasma seminal no arrojaron resultados positivos. Los iniciadores empleados, que fueron diseñados para su uso en PCR a tiempo real (Abril, C., et al., 2004), si lograron amplificar el fragmento esperado a partir del sobrenadante de cultivo de células con efecto citopático. La no amplificación a partir del plasma seminal se debió tal vez a la presencia de inhibidores, baja carga viral ó al método de extracción de ADN, entre otros (Bej, A.K., et al., 1991; Robertson, J.M; Walsh-Weller, J., 1998). Esto contrasta con la mayoría de los trabajos reportados previamente en los cuales han determinado una mayor sensibilidad del PCR (con distintos iniciadores o regiones a amplificar) con respecto al aislamiento viral en la detección del BoHV-1 virus a partir de semen (De Gee, A.L.W., et al., 1996; Rocha, M.A., et al., 1998; Deka, D., et al., 2005; Grom, J., et al., 2006; Smits, C.B., et al., 2000).

En el presente estudio, en las muestras positivas al virus, fue necesario mínimo 2-3 pasajes ciegos para evidenciar el daño citopático atribuido al BoHV-1 ó a cepas similares este virus. Acorde a los lineamientos internacionales, publicados por la OIE para el aislamiento del BoHV-1 a partir de semen, se establece un solo pasaje ciego (y 7 días de incubación) después de la primera inoculación en cultivo de

células, antes de declarar negativa ó positiva a una muestra (OIE., 2008). Congruente a lo observado, y a que ninguna de las muestras positiva mostró efecto citopático en MDBK en el primo cultivo ó en el primer pasaje ciego, es necesario realizar cuando menos 3 pasajes ciego de una muestra de fluido seminal antes de descartarla como negativa al BoHV-1. Esto tiene un fuerte impacto en el diagnóstico de la infección del BoHV-1, pues sería necesario un periodo mayor de tiempo e impactaría en el manejo de la infección a nivel de campo y en el animal. La identificación serológica de los aislados mostró variaciones, tanto mediante inmunofluorescencia como en los ensayos de seroneutralización, con respecto a la cepa control. La cepa Cooper, usada como control, fue aislada en 1955 a partir de fluidos nasales de bovinos con IBR (York, C.J., et al., 1957). Esta cepa, usada para generar el antisuero policlonal anti-BoHV-1 en cabras en el presente estudio, y cepas relacionadas han sido empleados por otros investigadores para identificar serológicamente distintos aislado del BoHV-1 (Metzler, A.E., et al., 1986; Bratanich, A.C., et al., 1991). Interesantemente, el antisuero fallo para neutralizar a 3 de los aislados a la misma dilución que a la cepa control. Esto también fue reflejado en la inmunofluorescencia en la cual estos mismos aislados mostraron menor intensidad de fluorescencia con respecto a la cepa control. Probablemente el origen de la cepa (tracto respiratorio) con respecto al origen de los aislados (tracto genital) influyó en esta observación. De cualquier manera, los datos nos sugieren que existen variaciones antigénicas en las cepas aisladas y es probable que estas cepas pertenezcan a distintos grupos genéticos o sean variantes antigénicas del BoHV-1. Diversos autores han mostrado la posibilidad de encontrar no solo distintas cepas de BoHV-1 en un mismo tejido (Whetstone, C.A., et al., 1989; Muylkens, B., et al., 2006)

si no también del la co-infección del BoHV-1 y BoHV-5 en el semen (Oliveira, M.T., et al., 2011). Será necesario realizar estudios subsecuentes para determinar si las cepas aisladas son una mezcla de distintos tipos o subtipos del virus, lo cual es factible que ocurra.

Acorde a la Oficina Internacional de Salud Animal (OIE), el BoHV-1 está clasificado en la lista B de las enfermedades de mayor significancia económica de los bovinos (OIE., 2008). A nivel mundial se reconoce que las vías de mayor importancia para introducir y mantener el virus en la población bovina son el movimiento de animales seropositivos (infectados) y el comercio de semen (Kupferschmied, H.U., et al., 1986). Los datos del presente trabajo resaltan la necesidad de, no solo reforzar los procedimientos diagnósticos de campo y laboratorio para detectar al virus en estado de latencia y en el semen, sino también el compromiso de establecer programas para la detección y control de este virus y de regulación sanitaria en el movimiento de ganado y semen en la región noreste de México.

6 Bibliografía

Abril, C., Engels, M., Liman, A., Hilbe, M., Albini, S., Franchini, M., Suter, M., Ackermann, M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *Journal of Virology*. **78**(7): 3644-3653.

Ackermann, M., Engels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*. **113**:293-302.

Alegre, M., Nanni, M., Fondevila, N. (2001). Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. *J. Vet. Med. B*. **48**: 613-621.

Avalos, R.R. (2002). Phylogenetische Analysen und antigenetische Verwandtschaft von Pestiviren. VVB Laufersweiler Verlag. Giessen, Deutschland. Pp.36-37. ISBN: 3-89687-594-9

Barenfus, M., Quadri Delli C.A., McIntyre, R.W., Schroeder, R.J. (1963). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **143**:725.

Bej, A.K. Mahbubani, M.H., Atlas, R.M. (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**:301-334.

Blickenstorfer, S., Engels, M., Guerdat, C., Saucy, C., Reist, M., Schwermer, H., Perler, L. (2010). Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in the canton of Jura: an epidemiological outbreak investigation. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **152**(12): 555-560.

Bracho, C.A., Jaramillo, A.C.J., Martínez, M.J.J., Montaña, H.A., Olgún, YB.A. (2006). Comparación de tres pruebas diagnosticas para el aborto por rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros. *Vet. Mex.*, **37** (2): 0301-5092.

Bratanich, A.C., Sardi, S.I., Smitsaart, E.N., Schudel, A.A. (1991). Comparative studies of BoHV-1 variants by in vivo and in vitro test. *Zentralblatt für Veteriärmedizin Reihe B.* **38**(1): 41-48.

Cantú, C.A. (2002). Factores asociados en la Epidemiología de los principales problemas reproductivos en bovinos productores de carne en el estado de Nuevo León. (IBR, BVD, Leptospirosis). <http://www.unionganaderanl.org.mx> .

Carbonero, A., Saa, L.R., Jara,D.V., García-Bocanegra, I., Borge, C., Perea, A. (2011). Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) infections in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Preventive of Veterinary Medicine.* **100**(1):84-88.

Cedillo, R.S. (2004). Charakterisierung rumianter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper. DVG Service GMBH, Giessen, Deutschland, pp. 36-39. ISBN: 3-938026-20-0

Chow, T.L., Molello, J.A., Owen, N.V. (1964). Abortion experimentally induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *J.Am.Vet. Med. Ass.* **144**:1005.

Chung, C.S., Pearson, L.D., Ayers, V.K., Collins, J.K. (1994). Monoclonal antibodies that distinguish between encephalitogenic Bovine Herpesvirus type 1.3 and respiratory Bovine Herpesvirus type 1.1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **1**(1):83-88.

Covarrubias, C.A. (2000). Enfermedades Reproductivas en Ganado Bovino. <http://www.ranchonet.com.mx/articulos>.

Crane, C.S., Lukas, G.N., Watkins, W.W. (1964). Infectious bovine rhinotracheitis abortion in Californian beef cattle. *J.Am. Vet. Med. Ass.* **144**:13.

Curtis, R.A., Van Dreumel, A.A., Ditchfield, J. (1966). Infectious Bovine Rhinotracheitis- Clinical, Pathological, and Virological aspect. *Can Vet. Jour.* **7(8)**:161-168.

De Gee, A.L.W., Wagter, L.H.A., Hage, J.J. (1996). The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology.* **53**: 163-168.

Deka, D., Ramneek, Maiti N.K., Oberoi, M.S. (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 (3)**: 1085-1094.

Delhon, G., Moraes, M.P., Lu, Z., Afonso, C.L., Flores, E.F., Weiblen, R., Kutish, G.F., Rock, D.L. (2003). Genome of Bovine Herpesvirus 5. *Journal of Virology.* **77(19)**:10339-10347.

Domínguez, D.D. (2009). Prevalencia y Factores de Riesgo asociados al Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRV), Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), *Leptospira* spp, y *Neospora caninum*, en hatos con sistema vaca-cría del Estado de Nuevo León. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Ellis, J., Waldner, C., Rhodes, C., Ricketts, V. (2005). Longevity of protective immunity to experimental bovine herpesvirus-1 infection following inoculation with a combination modified-live virus vaccine in beef calves. *J. Am. Vet. Assoc.* **227**(1):123-128.

French, E.L. (1962). Relationships between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. *Aus. Vet. J.* **38**: 555-556.

Google Maps (2009). <http://maps.google.com/maps> Consultado el día 10 de Septiembre de 2009.

Grom, J., Hostnik, P., Toplak, I., Barlič-Maganja, D. (2006). Molecular detection of BoHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of latently infected bull treated with dexamethasone. *The Veterinary Journal.* **171**: 539-544.

Jensen, R., Griner, L.A., Chow, T.L., Brown, W.W. (1955). Infectious bovine rhinotracheitis in feedlot cattle. 1. Pathology and symptoms. *Proc. U.S. live Stk.sanit. Ass.* **59**:189.

Jones, C. (2003). Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews.* **16**(1):79-95.

Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A., Oirschot, J.T. (1996a). Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Veterinary Microbiology.* **53**(1-2):103-110.

Kaashoek, M.J., Straver, P.H., Van Rooij, E.M., Quak, J., Van Oirschot, J.T. (1996b). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Veterinary Record.* **139**(17):416-421.

Kahrs, R.F. (2001). Infectious Bovine Rhinotracheitis and Infecious Pustular Vulvovaginitis. Viral Diseases of Cattle. 2^a.Ed. Iowa State University Press: Ames Iwoa, USA. **18**: 159-170.

Kennedy, P.C., Richards, W.P.C. (1964). The pathology of abortion caused by the virus of infectious rhinotracheitis. *Path. Vet.* **1**:17.

König, M. (2010). <http://www.vetmed.uni-giessen.de/viro/en/diagnostik.php>

Kupferschmied, H.U., Kihm, U., Bachmann, P., Müller, H.K., Ackermann, M. (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology* **25**: 439-443.

Lata, J. (2006). Detection of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection in breeding bulls by serological and molecular methods and its characterization by sequencing of PCR products. Thesis of Master of Veterinary Science. Anand Agricultural University. Departament of Veterinary Microbiology.

Lewin, H.A., Schmitt, K., Hubert, R., Van Eijk, M.J.T., Arnheim, N. (1992). Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: Genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics*.**13**:44-48.

Lovato, L., Inman, M., Henderson, G., Doster, A., Jones, C. (2003). Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene Leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *Journal of Virology*. **77**(8):4848-4857.

McKercher, D. G., Wada, E.M. (1964). The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. *J.Am. Vet. Med. Ass.* **144**:136.

Metzler, A.E., Schudel, A.A., Engels, M. (1986). Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant virus isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*. **87**: 205-207.

Miller, N.J. (1955). Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *J.Am. Vet. Med. Ass.* **126**:453.

Mirsky, M.L., Da, Y., Lewin, H.A. (1993). Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. *Genome Research*. **2**:333-340.

Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2006). Intraspacific bovine herpesvirus 1 recombinant carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *Journal of General Virology*. **87**:2149-2154.

Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* **38**: 181-209.

Nandi, S., Kumar, M., Manohar, M., Chauhan, R.S. (2009). Bovine herpesvirus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*. **10**:85-98.

Noordegraaf, A.V., Jalvingh, A.W., de Jong, M.C.M., Franken, P., Dijkhuizen, A.A. (2000). Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. *Prev. Vet. Med.* **44**:21-42.

Nuotio, L., Neuvonen, E., Hyytiäinen, M. (2007). Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet. Scand.* **49**:3

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008.

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.html

Oliveira, M.T., Campos, F.S., Dias, M.M., Velho, F.A., Freneau, G.E., Brito, W.M., Rijsewijk, F.A., Franco, A.C., Roehe, P.M. (2011). Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*. **75**(6):1139-1145.

Pidone, C.L., Galosi, C.M., Etcheverrigaray, M.E. (1999) Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria*. **19**,1/2: 40-50.

Reisinger, L., Reimann, H. (1928). –Beitrag zur Ätiologie des Bläschenauslages des Rind. *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* **15**:249-261.

Robertson, J.M., Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods Mol. Biol.* **98**:121-154.

Rocha, M.A., Barbosa, E.F., Guimarães, S.E., Dias Neto, E., Gouveia, A.M.G. (1998). A high sensitive-nested PCR assay for BoHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Veterinary Microbiology*. **63**(1):1-11.

Ruiz, J., Jaime, J., Vera, V. (2008) Latencia del herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL). *Acta biol. Colomb., Vol. 13 No.1*: 3-22.

Schynts, F., Meurens, F., Detry, B., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *Journal of Virology*. **77**(23):12535-12542.

Serra, H.X. (2004). Expresión de la Glicoproteína E del BoHV-1 en *Escherichia coli*. Determinación de una Secuencia Citotóxica. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Sheffy, B.E., Davies, D.H. (1972). Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**:974-976.

Smits, C.B., Van Maanen, C., Glas, R.D., De Gee, A.L.W., Dijkstrab, T., Van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A.M. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *Journal of Virological Methods.* **85**: 65-73.

Thiry, E., Saliky, J., Bublot, M., Pastoret, P.P. (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease.* **10**:59-63.

Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2006) Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* **37**: 169-190.

Thrusfield, M. (2007). *Veterinary Epidemiology* (3rd ed.). Blackwell Science. Ltd. ISBN: 978-1-405-15627-1

Van Engelenburg, F.A.C, Van Schie, F.W., Rijsewijk, F.A.M, Van Oirschot, J.T. (1995). Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in semen is Detected Much Longer by PCR than by Virus Isolation. *Journal of Clinical Microbiology.* **33** (2): 308-312.

Van Oirschot, J.T. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Veterinary Quarterly.* **17**(1):29-33.

Vogel, F.S., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Moraes, M.P., Braqanca, J.F. (2004). Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BoHV-1.2): acute balanopostitis, latent infection and detection of viral DNA

in region neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Veterinary Microbiology*. **98**(3-4):185-196.

Wang, J., Horner, G.W., O'Keefe, J.S. (2006) Genetic characterization of bovine herpesvirus 1 in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. **54**(2): 61-66.

Whetstone, C.A., Miller, J.M., Bortner, D.M., Van Der Maaten, M.J. (1989). Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch. Virol.* **106**:261-279.

Wiedmann, M., Brandon, R., Wagner, P., Dubovi, E.J., Batt, C.A. (1993). Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*. **44**(1):129-139.

Woodbine, K.A., Medley, G.F., Moore, S.J., Ramirez-Villaescusa, A.M., Mason, S., Green, L.E. (2009). A four longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. *BMC Veterinary Research*. **5**:5.

Xia, J.Q., Lofstedt, R.M., Yason, C.V., Kibenge, F.S. (1995). Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation. *Res. Vet. Sci.* **59**(2): 183-185.

Yates, W.D.G. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* **46**(3):225-263.

York, C.J., Schawarz, A.J., Estela, L.A. (1957). Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**:740-744.