

Diagnóstico virológico de *Herpesvirus bovino tipo-1* (Virological diagnostic of *Bovine herpesvirus type-1*)

Avila Sánchez, Mislay; Rodríguez Medina, Majela; Díaz de Arce, Heidý; Barrera Valle, Maritza

Grupo de Virología Animal. Dirección de Microbiología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

E-mail: mislay@censa.edu.cu

REDVET: 2008, Vol. IX, N° 3

Recibido: 28.09.07 / Revisado: 12.01.08 / Referencia: 030819_REDVET / Aceptado: 12.02.08 / Publicado: 01.03.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030819.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

RESUMEN

Dentro de las enfermedades virales graves para el bovino, se destacan las llamadas vesiculares, por su elevada contagiosidad y amplio rango de hospedero. Las mismas requieren un diagnóstico diferencial de otras enfermedades como: rinotraqueitis infecciosa bovina/vulbovaginitis pustular infecciosa, complejo diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas y mamillitis, por su similitud en cuanto a los signos clínicos. El desarrollo alcanzado por la ganadería en los últimos años ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que garanticen mayor rapidez, especificidad y sensibilidad en la detección de las enfermedades que afectan al ganado. Entre ellas, las de origen viral constituyen un gran peligro, pues al difundirse rápidamente ocasionan lamentables daños económicos. El *Herpesvirus bovino tipo-1*, es el agente causal de la IBR/IPV. El diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad se realiza mediante los métodos clásicos de detección del agente infeccioso como el aislamiento viral e identificación posterior por neutralización viral o inmunohistoquímica. Sin embargo, el aislamiento viral requiere facilidades de cultivos celulares, la presencia del virus replicándose y mucho tiempo para la obtención de los resultados. La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método basado en la amplificación *in vitro* del ácido nucleico. Es más sensible, rápido, específico, menos laborioso y más económico que la hibridación de ácidos nucleicos y que los métodos tradicionales de detección de este agente infeccioso. Permite detectar virus vivos e inactivados, animales portadores e infectados latentemente y posibilita la posterior caracterización molecular de los aislados a partir del ácido nucleico amplificado.

Palabras clave: *herpesvirus bovino tipo-1* | diagnóstico virológico | PCR

SUMMARY

Among the severe viral diseases for bovine, the vesicular disease has been pointed out due to its high infectiousness and wide host range. They require a differential diagnostic of other diseases such as: Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV), complex bovine viral diarrhea/disease of the mucous and mamillitis, due to its similarity as for the clinical signs. The development reached by the cattle raising in the last years has stimulated the search of new diagnostic methods which guarantee a higher speed, specificity and sensitivity in the detection of the diseases affecting cattle. Among these diseases, those of viral origin are dangerous, since their rapid spread causes great economic damages. *Bovine herpesvirus type-1* is IBR/IPV causal agent. The diagnostic of laboratory of this disease is carried out by the classical methods of the infectious agent detection such as the viral isolation and later identification by viral neutralization or immunohistochemistry. However, viral isolation requires cell culture and a lot of time to obtain the results. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a method based on the amplification *in vitro* of the nucleic acid. It is more sensitive, rapid, specific, less laborious and more economic than nucleic acid hybridization and than the traditional detection methods of this infectious agent. PCR allows detecting live and inactivated viruses, carrier and latently infected animals and it facilitates a later molecular characterization of isolates from the nucleic acid amplified.

Key words: *bovine herpesvirus type-1* | virological diagnostic | PCR.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo alcanzado por la ganadería en los últimos años ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que garanticen mayor rapidez, especificidad y sensibilidad en la detección de las enfermedades que afectan al ganado. Entre ellas, las de origen viral constituyen un gran peligro, pues, al difundirse rápidamente ocasionan lamentables daños económicos (Delgado y col., 2005).

Dentro de las enfermedades virales que más incidencia tienen en los costos de producción de los bovinos se encuentran, la rinotraqueitis infecciosa bovina (de sus siglas en Inglés, IBR) y la vulvovaginitis pustular infecciosa (de sus siglas en Inglés, IPV), enfermedades contagiosas que afectan a los bovinos de cualquier edad (Murphy y col., 1999; Thiry y col., 2006b). El agente causal es el *Herpesvirus bovino tipo-1* (HVB-1) que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Fauquet y col., 2005).

Afecta el tracto respiratorio y genital tanto del ganado silvestre como del doméstico y causa un conjunto de síndromes clínicos tales como conjuntivitis, aborto, enteritis e infecciones sistémicas en animales jóvenes (Arboleda y col., 1996). Puede producir infecciones latentes, lo cual tiene una significativa importancia epizootiológica dado el peligro que representan los animales sin manifestaciones clínicas y serológicamente negativos, pero que pueden liberar virus bajo condiciones de estrés, siendo esto un riesgo de infección permanente para otros animales (Pérez, 2005; Jones y col., 2006).

El diagnóstico de laboratorio de estas enfermedades se realiza mediante el uso de muchos de los métodos clásicos de detección del agente infeccioso como el aislamiento viral e identificación posterior por neutralización viral o inmunohistoquímica. Sin embargo el aislamiento viral requiere facilidades de cultivos celulares, la presencia del virus replicándose y mucho tiempo para la obtención de los resultados (Moore y col., 2000; Delgado, 2001). Actualmente, el PCR es un método muy novedoso basado en la detección del ácido nucleico que permite un diagnóstico de la enfermedad de forma muy rápida, con elevada especificidad y sensibilidad.

El presente texto pretende abarcar todo lo relacionado con el *Herpesvirus bovino tipo-1* y su diagnóstico virológico, y poder transmitir aquellos aspectos de mayor interés, conociendo los avances más recientes internacionales como nacionales en esta temática. Pretendemos pues, que este texto se convierta en fuente actualizada de consulta, ayude a aclarar, enriquecer los aspectos tratados y sea útil para aquellos que se interesen en el tema.

DESARROLLO

1. *Herpesvirus bovino tipo 1.*

1.1. Clasificación taxonómica.

Herpesvirus bovino tipo 1, también conocido como virus del complejo rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Fauquet y col., 2005). Ha sido clasificado en dos subtipos: HVB-1.1 y HVB-1.2, a su vez el HVB-1.2 se divide en HVB-1.2a y HVB-1.2b, mediante el uso de electroforesis de proteínas virales en geles de poliacrilamida, el uso de paneles de anticuerpos monoclonales y el análisis de las diferencias del ácido nucleico viral detectadas por la digestión con enzimas de restricción o por amplificación diferencial en el ensayo de PCR (Metzler y col., 1985; Rijsewijk y col., 1999).

El subtipo 1.1 se asocia con la forma respiratoria de la enfermedad, IBR, mientras que el subtipo 1.2 se asocia tanto con esta enfermedad respiratoria como con las genitales, IPV/IPB (Engels y col., 1981 y Wentink y col., 1993).

Ellos difieren en los epítopes de la glicoproteína C (gC), lo cual puede alterar la adhesión viral e influir en las diferentes virulencias que presentan (Rijsewijk y col., 1999). Las cepas del subtipo HVB-1.1 son las más virulentas y causan las enfermedades de mayor severidad asociadas a las infecciones con HVB-1. Este subtipo es excretado en altos títulos en secreciones nasales y diseminado más efectivamente que el 1.2 (Edwards y col., 1991).

1.2. Características biológicas.

Los herpesvirus son virus envueltos, tienen un diámetro de 150-200 nm, ADN doble cadena lineal y una cápsida con isometría icosaédrica de alrededor de 100 nm de diámetro compuesta de 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros). La cápsida está rodeada por una capa de material globular, conocido como tegumento, y alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Murphy y col., 1999).

Los alphaherpesvirus presentan un rango amplio de posibles hospederos y alta capacidad para establecer infecciones latentes. El ciclo reproductivo es relativamente corto, y crecen fácilmente en cultivos celulares (Roizman y Pellett, 2001; Jones, 2003).

La multiplicación de HVB-1 en células de origen bovino, produce efecto citopático que se caracteriza por la formación de cuerpos de inclusión intranucleares llamados "de Cowdry" al inicio de la infección y posterior redondeamiento de las células las cuales forman como "racimos de uva", hasta la total destrucción de la monocapa (Lesko y col., 1993; Suresh y col., 1993).

Otras de las características biológicas del virus son la formación de placas de 1-2 mm en monocapas de células de riñón y de testículos bovinos, la sensibilidad al éter, al calor y a la tripsina (Noda y Barrera, 1985 y 1986). Es estable a pH 7 o ligeramente superior y no resiste la desecación (Griffin y col., 1958;; Rouhander y col., 1967 y Bartha y col., 1969, citados por Barrera, 1996).

1.3. Organización de genoma.

El ácido nucleico de HVB-1 tiene una densidad de flotación de 1.73 g/cm³ en Cloruro de Cesio, un peso molecular de 138 kpb y un contenido de bases Guanina-Citosina (GC) de 72% (Black y Slack, 1972). Alrededor del 10% transporta en el extremo terminal derecho una "cola" de ADN celular, lo que indica que el material genético del virus puede recombinarse frecuentemente con el de la célula (Pidone y col., 1999). Está dividido en dos secuencias únicas unidas covalentemente: Una larga y una corta. Presenta secuencias repetidas que generalmente se localizan en los extremos o internamente. Las secuencias repetidas permiten la inversión de las secuencias únicas de manera que durante la replicación vírica se obtienen isómeros del genoma en cantidades equimolares (Fauquet y col., 2005).

Los genes se clasifican en tres categorías: (i) codificadores de las proteínas que intervienen en la replicación viral (genes muy tempranos y genes tempranos), (ii) que codifican proteínas estructurales (genes tardíos) y (iii) un grupo de genes heterólogos opcionales en la secuencia que no son encontrados en todos los herpesvirus y no son esenciales para la replicación en cultivo celular (Murphy y col., 1999).

1.4. Proteínas virales.

El genoma de HVB-1 codifica para alrededor de 70 proteínas de las cuales se ha demostrado que 33 son estructurales y alrededor de 15 son no estructurales (Manual de la OIE, 2004a; Fauquet y col., 2005).

En la envoltura están localizadas alrededor de 12 glicoproteínas, la mayoría están proyectadas como peplómeros y tienen un importante papel en la patogenicidad y en la inmunidad, tal es el caso de gB, gC, gD y gE (Engels y Ackermann, 1996; Kaashoek y col., 1998). Otras proteínas estructurales se encuentran en la nucleocápsida y una menor cantidad está asociada al ADN (Mettenleiter, 2004).

Las proteínas no estructurales están involucradas en el metabolismo del ácido nucleico (timidina quinasa, sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y el procesamiento proteico (proteína quinasa, entre otras) (Murphy y col., 1999).

1.5. Replicación viral.

La replicación de HVB-1 ocurre en células epiteliales del tracto tanto respiratorio como reproductivo y se inicia a las dos horas postinfección (Engels y Ackermann, 1996 y Meurens y col., 2004).

El virus al comienzo del ciclo de multiplicación viral se adhiere a través de las glicoproteínas de la envoltura gB, gC y gD a sus receptores en la superficie de las células hospederas, que son los proteoglicanos de sulfato de heparán. La nucleocápsida penetra en el citoplasma mediante la fusión de la envoltura con la membrana celular o a través de vacuolas fagocíticas. El complejo ADN-proteína es liberado de la nucleocápsida y entra en el núcleo. Rápidamente se detiene la síntesis macromolecular de la célula hospedera y ocurre la replicación del ADN vírico (Byrne y col., 1995; Mettenleiter, 2004). El genoma de los herpesvirus solo codifica proteínas que son esenciales en la replicación viral, el resto de los materiales son adquiridos de la célula hospedera (Murphy y col., 1999).

El ADN sintetizado se ensambla en las cápsidas y el virus adquiere la envoltura a medida que gema por la membrana nuclear. El virión maduro se acumula en vacuolas en el citoplasma y es liberado por exocitosis o citolisis o puede pasar de una célula a otra a través de los puentes intercelulares (Mettenleiter, 2004).

1.6. Latencia.

HVB-1 establece infección latente en las neuronas sensoriales del ganglio trigémino o sacro e incluso en las tonsilas. Entra al animal por la nariz y se replica en las membranas de la mucosa del tracto respiratorio superior y en las tonsilas. Luego se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hasta alcanzar el ganglio trigémino. Tras la infección genital, se replica en la membrana mucosal de la vagina o prepucio y se hace latente en el ganglio sacro. El virus puede reactivarse bajo condiciones de estrés, con presentación usualmente subclínica de la enfermedad y excretarse de forma intermitente al ambiente, lo que constituye una fuente de infección para animales susceptibles (Jones y col., 2000; Lovato y col., 2003; De Regge y col., 2006).

La reactivación puede ocurrir por factores estresantes naturales o artificiales como: Parto, transporte, tratamiento con ciclofosfamida o dexametasona, irradiación ultravioleta y superinfección con otros virus o microorganismo (Mars y col., 2000b; Winkler y col., 2000a; Pérez y col., 2005).

2. Características de la enfermedad.

2.1. Transmisión.

HVB-1 se transmite en forma directa por contacto con animales infectados, a partir de secreciones respiratorias, oculares y del tracto reproductivo, o de manera indirecta a través de personas o equipos (Pidone y col., 1999). La salivación de animales positivos sobre el alimento y su movimiento hacia grupos de animales negativos, constituye una fuente esencial de transmisión viral en unidades de ceba (Ackermann y Engels, 2006). También puede ser transmitido durante la transferencia de embriones y a través del semen, en la monta natural o inseminación artificial (van Oirschot, 1995; Mars y col., 2000a).

El ganado es la única fuente significativa de diseminación viral, aunque otras especies pueden ser infectadas ellas probablemente no contribuyen a la dispersión del virus (Wentink y col., 1993 y Thiry y col., 2006a).

2.2. Patogenia y síntomas clínicos.

El período de incubación depende del modo de infección, de la virulencia y la cantidad de virus que penetra al organismo, a través de la cavidad nasal, la orofaringe, ojos y tracto genital. Se multiplica en las células epiteliales de las puertas de entrada, lo cual ocasiona los síntomas clínicos. Tras la viremia, es llevado a los órganos de multiplicación secundaria a través de puentes intercelulares, por la sangre y el sistema nervioso (Zacarias, 2002).

El HVB-1 es el principal patógeno del ganado (Muylkens y col., 2006). La lesión primaria es un foco de necrosis en la membrana nasal, laringea, de la traquea o de la mucosa genital. Es secuela directa de la replicación viral y su subsiguiente efecto citopático. Las lesiones pueden desaparecer para formar grandes pústulas que consisten en infiltrados masivos de leucocitos (Murphy y col. 1999).

Se han descrito para HVB-1 una amplia variedad de signos clínicos como consecuencia de su acción sobre los sistemas respiratorio, genital, digestivo y nervioso (Straub, 2001).

La forma respiratoria de la enfermedad, IBR, es la más importante por su elevada morbilidad y baja mortalidad. Se caracteriza por fiebre (40.5-42 °C), depresión general, inapetencia, anorexia, abundante descarga nasal, inicialmente serosa y después de unos pocos días cambia a mucopurulenta, dificultad respiratoria, exceso de salivación y en algunos casos acompañada de aborto en hembras gestantes (Murphy y col., 1999; Thiry y col., 2006b).

Los animales con IBR pueden desarrollar conjuntivitis uni o bilateral. Esta también constituye una forma clínica y se caracteriza por el desarrollo de inflamación, enrojecimiento de la conjuntiva, la presencia de secreción serosa al inicio de la infección y mucopurulenta al final, con queratitis sin ulceración de la cornea si no se produce contaminación bacteriana secundaria (Obando, 1994; Pidone y col., 1999).

En las vacas la forma genital produce IPV y en los toros IPB. Se caracterizan por enrojecimiento y edema con pequeñas pústulas que al desprenderse dejan una zona erosionada. Presentan secreción mucopurulenta abundante tanto en la mucosa de la vulva como del pene (Obando, 1994).

La forma digestiva de la enfermedad afecta terneros de una a tres semanas, causa fiebre, diarrea y aparecen en la mucosa del tracto digestivo lesiones necróticas de color blanco. La enfermedad evoluciona en forma aguda con alta mortalidad. La gastroenteritis puede ocurrir en ganado adulto (Murphy y col., 1999).

La infección con HBV-1 puede causar meningoencefalitis esporádicamente (Manual de la OIE, 2004a). También se han descrito casos de mastitis, enteritis, metritis, dermatitis, tonsilitis e infecciones sistémicas en animales jóvenes (Pidone y col., 1999).

3. Inmunidad.

La respuesta inmune a HVB-1 comienza desde que el virus se replica. El número de células citóxicas naturales y las secreciones, tanto nasales como vaginales de interferón (INF) tipo I, se incrementan y pueden estar relacionados con una protección local inmediata en estadios tempranos de la infección (Babiuk y col., 1996).

La respuesta inmune adaptativa ocurre a los siete días postinfección. Los anticuerpos neutralizantes producidos como parte de ella, están dirigidos contra las glicoproteínas de la envoltura y probablemente sean importantes en la inmunidad a largo plazo, sin embargo, su función en la prevención de la diseminación viral se cuestiona, debido a que el virus puede escapar a través de puentes intercelulares y de las ramas nerviosas (De Regge y col., 2006).

Los anticuerpos producidos por vacunación con HVB-1 persisten a niveles detectables durante tres años y los maternos durante 123 días tras el destete a los dos meses de edad (Hage y col., 1998 y Fulton y col., 2004).

La respuesta inmune mediada por células frente a este virus, incluye la producción de macrófagos, interleuquina -2 e $INF\gamma$ y células citóxicas naturales activadas, la proliferación de células TCD4+ específicas para gC y gD y la estimulación de linfocitos T citotóxicos. Se ha demostrado que los $INF\gamma$, α y β protegen contra la infección e impiden la diseminación viral. Las respuestas a la infección por este agente son de amplio espectro, incluyen células T colaboradoras tanto 1 como 2 (Mena y col., 2002; Abril y col., 2004; Favoreel y col., 2006).

Una de las consecuencias de la infección inducida por HVB-1, es la depresión de la respuesta inmune mediada por células, lo cual está relacionado con una mayor susceptibilidad a las infecciones secundarias tanto virales como bacterianas que pueden causar neumonías (Sánchez y col., 2003; Hodgson y col., 2005).

4. Tratamiento y control.

En el control y prevención del HVB-1 son esenciales las medidas higiénicas que se asumen en la granja. Se debe aceptar solamente en el rebaño aquel ganado que resultó ser HVB-1 seronegativo tras una cuarentena (Ackermann y col., 1990; Ackermann y Engels, 2006).

Ante una alta incidencia de la enfermedad es imprescindible que se tomen rápidamente medidas de control como la inmunización activa. Se han usado muchas vacunas vivas atenuadas e inactivadas, así como vacunas de subunidades y marcadas. La vacunación reduce la severidad de la enfermedad, la replicación viral y la transmisión, pero no es capaz de prevenir la infección, tampoco impide la latencia, ni protege contra la reactivación de la infección (Lemaire y col., 2000; Muylkens y col., 2006; Thiry y col., 2006b y van Drunen Littel-van den Hurk, 2006).

Algunos tratamientos incluyen drogas antivirales, muchas de ellas resultan efectivas *in vitro*, pero no lo son a dosis atóxicas *in vivo*. Los antibióticos de amplio espectro se emplean para controlar las complicaciones bacterianas y/o fúngicas en la IBR. En los casos de IPV/IPB se aplican localmente antisépticos o ungüentos de penicilina-estreptomicina (Pidone y col., 1999).

5. Diagnóstico de la enfermedad.

5.1. Pruebas serológicas.

El diagnóstico del HVB-1 se puede realizar mediante la detección de la presencia de anticuerpos específicos en el suero de los animales. La serología positiva proporciona un indicador útil y confiable del estado de infección. Cualquier animal con anticuerpos del virus es considerado un portador y un potencial excretor intermitente, excepto en el caso de terneros jóvenes que adquieren de forma pasiva anticuerpos de la madre y el ganado que está sano y vacunado (Favoreel y col., 2000).

Entre las técnicas serológicas que se han empleado para diagnosticar esta enfermedad se encuentran: Inmunodifusión en gel de agar (Afshar, 1970), Hemoaglutinación pasiva (Suresh y col., 1992), Inmunofluorescencia indirecta (Ahmed, 1999), Fijación del complemento (Faye y col., 1975) y Contrainmunolectroforesis (Aruna y Suri Babu, 1992). Todas estas tienen el inconveniente de su baja sensibilidad. Las técnicas de seroneutralización (SN) y varios Ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (de sus siglas en Inglés, ELISA) son empleados usualmente para detectar anticuerpos contra HVB-1 en suero (Puntel, 1999; Manual de la OIE, 2004a).

La prueba de SN demora varios días para obtener los resultados y requiere facilidades de cultivo de tejidos. Por otra parte, la técnica de ELISA tanto de tipo indirecto, que es más comúnmente usado, como de bloqueo, generalmente más sensible, ha reemplazado rápidamente a las demás pruebas serológicas, debido a que prescinde del uso de cultivo celular, es sensible, rápido y económico (Pidone y col., 1999; Manual de la OIE, 2004a).

5.2. Identificación del agente infeccioso.

Debido a la característica del HVB-1 de producir infecciones latentes (Pérez y col., 2005; Jones y col., 2006), una muestra de suero única, positiva a anticuerpo, indica que el animal está infectado, pero no que hay excreción viral en el momento del muestreo. Para aumentar la eficiencia del diagnóstico se requiere detectar antígenos virales en las secreciones, los órganos y el semen pues nos indica que este agente puede ser la causa de la infección primaria que padece el animal (Lemaire y col., 1994).

Para la identificación del agente infeccioso se han empleado técnicas, tales como el aislamiento viral, técnicas de detección del antígeno viral que incluye Inmunofluorescencia Directa (IFD), Inmunoperoxidasa Directa (IPD), ELISA y otras de detección de ácido nucleico como hibridación ADN-ADN y la PCR (Manual de la OIE, 2004a).

5.2.1. Aislamiento viral.

Para el aislamiento viral son usados varios cultivos de células de origen bovino. El virus produce un efecto citopático en la monocapa alrededor de los 2–4 días después de la inoculación y es identificado mediante SN u otros métodos de detección de antígeno a través de antisuero monoespecífico o anticuerpo monoclonal (Manual de la OIE, 2004a).

El aislamiento viral en cultivo celular es considerado el “estándar de oro” para la detección de HVB-1, pero necesita mucho tiempo para obtener los resultados ya que en dependencia del número de pases ciegos en cultivo de tejido dicho procedimiento puede demorar de una a tres semanas para completar el efecto. Este método de diagnóstico brinda resultados variables y depende de la presencia de un número suficiente de partículas infecciosas viables (Masri y col., 1996; Takiuchi y col., 2005). Algunos tejidos tienen enzimas que son tóxicas para la célula en cultivo y adicionalmente pueden contener inhibidores virales que interfieren con el aislamiento (Moore y col., 2000).

5.2.2. Detección del antígeno viral.

Un método alternativo para la identificación viral en secreciones y tejidos es a través de la demostración directa del antígeno de HVB-1 en células que están alrededor del efecto citopático por pruebas inmunohistoquímicas como la IFD o IPD con un antisuero monoespecífico o anticuerpo monoclonal conjugados (Delgado y col., 1992; Ganges y col., 1997).

El ELISA es otra técnica para la detección directa y rápida del antígeno viral, este puede ser capturado por anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales en fase sólida (Pico y col., 1997).

Spilki y col., 2005, describieron un ensayo tipo ELISA basado en un anticuerpo monoclonal que permitió discriminar entre el ganado inmunizado con HVB-1.1 y HVB-1.2. La discriminación satisfactoria con ese anticuerpo está basada en las diferencias observadas entre subtipos en la región amino terminal de gC (Rijsewijk y col., 1999).

Estas técnicas poseen cierta rapidez en el diagnóstico ya que pueden ser ejecutadas en un día y no requieren de cultivos celulares, ni de posterior caracterización viral. Sin embargo, tienen menor sensibilidad en la detección directa de antígenos, comparadas con el aislamiento viral, parámetro que se ha mejorado con el uso de anticuerpos monoclonales (Delgado, 2001; Manual de la OIE, 2004a).

La IPD tiene algunas ventajas sobre la IFD pues no necesita microscopio fluorescente, no desaparece la coloración después del examen, tiene menos coloración de fondo por lo que es menos subjetiva y se puede aplicar a tejidos fijados y embebidos en parafina (El-Manakhly y col., 1997 y Martin y col., 1997).

5.2.3. Detección del ADN viral.

Se han desarrollado técnicas de detección de ADN del HVB-1 en secreciones nasales, ganglio y en semen, que han incrementado la sensibilidad del diagnóstico hasta la determinación de picogramos de ácido nucleico viral (Gupta y col 1995).

La técnica de hibridación de ácido nucleico puede ser en forma de dot o *in situ*. Un ADN con una secuencia de bases específica puede identificarse mediante la Técnica de Transferencia de Southern o más comúnmente conocida como Southern blotting (Voet y Voet, 2004). Por otra parte, la hibridación *in situ* se emplea para detectar el ADN de HVB-1 en ganglio, a partir de cortes de tejido (Torres, 1997; Winkler y col., 2000b).

Las pruebas de hibridación a menudo disminuyen el tiempo necesario para identificar organismos infecciosos, sin embargo el empleo de sondas las hace más caras que los métodos tradicionales, requieren un manejo del ADN amplificado y la interpretación de los

resultados puede ser técnicamente subjetiva. Por su complejidad no se consideran adecuadas para la práctica común en los laboratorios de diagnóstico (Torres, 1997; Manual de la OIE, 2004a).

El estudio con enzimas de restricción del HVB-1 ha sido extensamente utilizado como técnica diagnóstica, ya que la estabilidad de los genomas del HVB-1 permanece sin afectarse por pasajes *in vitro* en células huésped homólogas o por latencia (Engels y col., 1986).

La técnica de PCR fue formulada por Kerry Mullis en 1985. Es un método rápido, *in vitro*, capaz de amplificar de forma enzimática un segmento específico de ADN de hasta 6 kb en cientos de miles y millones de veces (Voet y Voet, 2004).

El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro (Satz y Kornblihtt, 1993). La sensibilidad analítica es alta, con un número mínimo de 100 a 1000 copias del ADN diana detectable (Rodríguez y Barrera, 2004). La especificidad analítica puede ser también alta, depende de la selección del blanco, del diseño de los cebadores y la optimización del ensayo (Rola y col., 2005).

Entre otras ventajas de la técnica de PCR se encuentran que puede ser usada en una amplia variedad de muestras como tejidos, secreciones, fluidos corporales y materiales de cultivo de tejidos que contienen partículas viables y no viables. Además, es rápida, pues los resultados se obtienen en pocas horas, es reproducible, menos laboriosa y más económica que la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (Leary y Splitter, 1992 y Williams y Kwok, 1992, citados por Yason y col., 1995).

Este es el ensayo molecular de mayor variedad y aplicación en el diagnóstico veterinario (Moore y col., 2000). También puede ser usado en la genotipificación, en los análisis filogenéticos de patógenos veterinarios (Schmitt y Henderson, 2005) y para detectar animales infectados latentemente (Yason y col., 1995; Deka y col., 2005). Sin embargo, es propenso a la contaminación y por tanto deben tomarse precauciones para prevenir resultados falsos-positivos (Manual de la OIE, 2004a).

En el procedimiento convencional de PCR (PCR simple), ocurren varios ciclos de amplificación, de 20 a 40. En cada uno, las dos cadenas de ADN son separadas por desnaturalización a elevada temperatura, ésta es entonces disminuida para lograr la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias. Luego la ADN polimerasa, a la temperatura de extensión y dirigida por los cebadores, sintetiza la nueva cadena de ADN complementaria a la secuencia diana. Finalmente, se obtiene una cantidad de ADN que resulta suficiente para operaciones posteriores tales como la detección, el clonaje o la secuenciación (Voet y Voet, 2004).

Este método de PCR ha sido modificado de diversas maneras según Manual de la OIE, 2004a, y se han obtenido diferentes tipos de PCR con sus correspondientes protocolos y ventajas según la situación. Entre los más usados se encuentran el PCR anidado (del Inglés, Nested PCR) que emplea dos parejas de cebadores en dos rondas sucesivas del ensayo de PCR, la segunda pareja amplifica una secuencia diana en el producto de amplificación de la primera ronda, el PCR Múltiple (del Inglés, Múltiplex PCR) que utiliza varios cebadores dirigidos a blancos diferentes y el PCR de la transcripción reversa (de sus siglas en Inglés, RT-PCR), que se emplea para amplificar, aislar o identificar una secuencia de ARN.

Otros son: el PCR inverso, empleado si solo se conoce una secuencia interna y es muy útil en la identificación de secuencias que flanquean varios insertos genómicos, el PCR asimétrico, usado fundamental en los procesos de secuenciación y el PCR Touchdown que reduce la hibridación no específica de los cebadores por la variación de las temperaturas de hibridación entre ciclos (Manual de la OIE, 2004a).

Una innovación reciente dentro de las técnicas de biología molecular es el PCR en tiempo real (del Inglés, real time PCR). Permite medir directamente el incremento en la cantidad de ADN que se amplifica durante cada ciclo, mediante diferentes tinciones fluorescentes y sondas de hibridación, lo cual incrementa la especificidad del ensayo (Leutenegger, 2001; Dorak, 2006). Es un método rápido, sensible y con un riesgo de contaminación muy bajo (Niesters, 2001; Mackay, 2004).

Para el diagnóstico de HVB-1 se han descrito varias metodologías de PCR las cuales se han dirigido a diferentes genes dianas en el genoma viral, entre ellos están los genes *gB*, *gC*, *gD*, *gE* y el gen *tk* (Wiedman y col., 1993; Kibenge y col., 1994; Fuchs y col., 1999; Schynts y col., 1999).

Varios PCR han sido realizados a partir de muestras de semen infectado artificialmente (Xia y col., 1995) o naturalmente (Van Engelenburg y col., 1995), exudado nasal (Alegre y col., 2001), ganglio sensorial infectado latentemente (Van Engelenburg y col., 1993) e incluso a partir de las tonsilas (Winkler y col., 2000a).

Smits y col., 2000, compararon tres ensayos de PCR con el método de aislamiento viral para la detección de HVB-1. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad, con valores de 98%, 73% y 100%, para el PCR A, B y C respectivamente, en semen fresco, mientras que para el aislamiento viral se obtuvo sólo un 49%. Un trabajo similar fue realizado por Deka y col., 2005, donde el aislamiento viral mostró una sensibilidad y especificidad respecto al PCR para el gen I de 57.14% y 70%.

Con el propósito de detectar y diferenciar herpesvirus bovinos se han desarrollado diferentes PCR. Ros y col., 1999, discriminaron entre HVB-1 de HVB-5 mediante el empleo de un mismo sistema de cebadores para la amplificación de un fragmento de gen *C*, que aprovecha la gran variabilidad de la secuencia N-terminal para diferenciar los productos de amplificación según sus tallas, 273 y 298 pb. Pompeo y col., 2005, también emplean el mismo gen diana para la detección simultánea de estos herpesvirus con un PCR múltiple. Este mostró un límite de detección de 5 y 50 T_{ICD}₅₀, en diluciones seriadas de las cepas LA (HBV-1) y AA 01 (HBV-5) respectivamente. Otros autores sin embargo, han desarrollado PCR múltiples en los cuales amplifican regiones de genes diferentes para cada tipo de herpesvirus bovino, tal es el caso del gen *tk* para HBV-1 y el gen *D* para HBV-5 utilizados por Alegre y col., 2001.

La selección del gen *tk* para el diagnóstico de HBV-1, ha sido efectiva en un gran número de remisiones diagnósticas de rutina debido a su importancia en la patogenidad viral de todos los herpesvirus bovino, por tanto, la secuencia de ADN que amplifica la timidita quinasa está presente en todas las cepas patógenas del virus (Masri y col. 1996; Moore y col. 2000).

La técnica de PCR para ser aplicada como método diagnóstico debe ser validada. La validación es la evaluación de un proceso para determinar su utilidad con un propósito particular. La consideración más importante de este ensayo es la capacidad de sus resultados de producir exactamente el estatus de infección de un animal o una población de animales. Un ensayo de PCR validado consistentemente, provee resultados que identifican los animales como positivos o negativos a la presencia de material genético viral. Se reconoce como validado si se dispone de estimaciones confiables de la sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica, obtenidas a partir de una población diana, lo cual no implica la existencia de un umbral mínimo para estos parámetros (Manual de la OIE, 2004b).

CONCLUSIONES

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método basado en la detección del ácido nucleico, Es más sensible, rápido, específico, menos laborioso y más económico que la hibridación de ácidos nucleicos y que los métodos tradicionales de detección de este agente infeccioso. Permite detectar virus vivos e inactivados, animales portadores e infectados latentemente y posibilita la posterior caracterización molecular de los aislados a partir del ácido nucleico amplificado. Además, permite crear un sistema con el cual se diagnostique la presencia de enfermedades vesiculares de las enfermedades diferenciales. Esto es muy importante ya que la IBR conjuntamente con el complejo enfermedad de las mucosas/diarrea viral bovina y la Mamilitis deben ser descartadas en el esquema de diagnóstico de las enfermedades vesiculares de declaración obligatoria para la Organización Internacional de Epizootia (OIE) por presentar síntomas clínicos similares. Todas estas razones han hecho del ensayo de PCR una herramienta útil para el diagnóstico virológico, de forma general, así como para la detección específica de HVB-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abril, C.; Engels, M.; Liman, A.; Hilbe, M.; Franchini, S.; Suter, M. y Ackermann, M. (2004): Both Viral and Host Factors Contribute to Neurovirulence. Herpesvirus 1 and 5 in Interferon Receptor-M. *J. Virol.* 78(7): 3644-3653.
2. Ackerman, M.; Bélak, S.; Bitsch, V.; Edwards, S.; Moussa, A.; Rockborn, G. y Thiry, E. (1990): Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Vet Microbiol.* 23: 361-363.
3. Ackermann, M. y Engels, M. (2006): Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113: 293-302.
4. Afshar, A. (1970): Occurrence of precipitating antibodies to bovine herpesvirus (IBR) in sera of farm animals and man in Iran. *J. Comp. Pathol.* 80: 307-310.
5. Ahmed, I.; Hameed, A.; Memon, M. y Naeem, K. (1999): Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 among cattle and buffaloes in Pakistan. *Pakistan-Veterinary-Journal.* 19(2): 60-63.
6. Alegre, M.; Nanni, M. y Fondevila, N. (2001): Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and -5. *J. Vet. Med. B.* 48(8): 613-621.
7. Arboleda, J. J.; Rodas, J. D.; Ossa, J. E. y Zuluaga, F. N. (1996). Espectro Clínico y Epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 9(1-2): 3-13.
8. Aruna, D. y Suri Babu, T. (1992): Immunoprecipitation tests for detection of IBR virus. *Indian J. Anim. Sci.* 62: 414-415.
9. Babiuk, L. A.; Van Drunen Littel-van der Hunk y Tikoo, S. K. (1996): Immunology og bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 53: 31-42.
10. Barrera, M. (1996): Herpesvirus Bovino-1: Obtención de Medios de Diagnóstico y Prevención. *Tesis para la Opción del Grado Científico de Dr.C. Veterinaria. ISCAH. CENSA. Cuba.*
11. Bartha, A.; Bélak, S. y Benyeda, J. (1969): Tripsina and heat resistance of some strains of the herpesvirus group. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19(1): 97-99.
12. Black, D. N. y Slack, G. (1972): Comparison of two strains of IBR virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 39(4): 330-337.
13. Byrne, K. M.; Horohov, D. W. y Kousoulas, K. G. (1995): Glycoprotein B of Bovine Herpesvirus-1 Binds Heparin. *Virology.* 209(1): 230-235.
14. De Regge, N.; Favoreel, H. W.; Geenen, K. y Nauwynck, H. J. (2006): A homologous in vitro model to study interactions between alphaherpesviruses and trigeminal ganglion neurons. *Vet. Microbiol.* 113: 251-255.
15. Deka, D.; Ramneek; Maiti, N. K. y 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.

16. Delgado, I. D. (2001): Introducción a la práctica productiva de la Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa Directas, para el diagnóstico de Parainfluenza 3 Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. Producción y aplicación de los diagnosticadores. *Tesis para la opción del grado de Master en Ciencias. Uiversidad Agraria de La Habana. Cuba.*
17. Delgado, I. D.; Barrera, M. V.; Rodríguez, N. B.; Sánchez, L. M.; Mendoza, S. E. y Ciprián, A. C. (2005). Utilización de estuches de diagnóstico de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas para la determinación de parainfluenza 3 bovina y herpesvirus bovino tipo 1 en Cuba. *Vet. Méx.* 36(3): 295-302.
18. Delgado, I.; Barrera, M.; Tuero, C. y Rodríguez, N. (1992): Comparación de tres métodos de detección de antígeno para el diagnóstico de HVB-1. *Rev. Salud Anim.* 14: 143-148.
19. Dorak, M. T.: Real-Time PCR. <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>> Última actualización el 11 de enero de 2006, consultado 4 de abril de 2006.
20. Edwards, S. Newman, R. H. y White, H. (1991): The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relation to viral genotype. *Br. Vet. J.* 147: 216-231.
21. El-Manakhly, E. M.; El Ballal, S. S. y Zaghawa, A. (1997): Histopathological and immunohistochemical study of calves naturally infected with bovine herpes virus-1 (bovine herpesvirus 1). *Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology.* 10(2): 29-37.
22. Engels, M. y Ackermann, M. (1996): Patogénesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 53: 3-15.
23. Engels, M.; Giuliani, C.; Wild, P.; Beck, T. M.; Loepfe, E. y Wyler, R. (1986): The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to know BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research* 6: 57-73.
24. Engels, M.; Steck, F. y Wyler, R. (1981): Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 67(2): 169-174.
25. Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; y Ball, L.A. (eds) (2005): Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier, Academic Press. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-fst-g.htm>> Última actualización enero del 2005, consultado 28 de marzo de 2006.
26. Favoreel, H. W.; Nauwynck, H. J. y Pensaert, M. B. (2000): Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. *Arch. of Virol.* 145(7): 1269 – 1290.
27. Favoreel, H. W.; Van Minnebruggen, G.; Van de Walle, G. R.; Ficinska, J. y Nauwynck, H. J. (2006): Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: Bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies. *Vet. Microbiol.* 113: 257-263.
28. Faye, P.; Chartow, A. y Leleyec, C. (1975): Etude sérologique chez le lapin experimentalment infecté par le virus de la rhinotrachéitis infectieuse des bovins (virus IBR/IPV). *Bull. Acad. Vet.* 98: 67-70.
29. Fuchs, M.; Hübert, P.; Detterer, J. y Rziha, H. J. (1999) : Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2498-2507.
30. Fulton, R. W.; Briggs, R. E.; Payton, M. E.; Confer, A. W.; Saliki, J. T.; Ridpath, J. F.; Burge, L. J. y Duff, G. C. (2004): Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV)1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine.* 22: 643-649.
31. Ganges, L.; Barrera, M.; Cedeño, I. y Montalvo, J. M. (1997): Diagnóstico de Herpesvirus bovino-1 en toros mediante Inmunoperoxidasa e Inmunofluorescencia. *Rev. Salud Anim.* 19(1): 51-52.
32. Griffin, T. P.; Howells, W. V.; Crandell, R. A. y Maurer, F. D. (1958): Stability of the virus IBR. *Am J. Vet. Res.* 19: 990-992.

33. Gupta, P. K.; Chaudhuri, P.; Sharma, B.; Singh, V. P. y Balain, D. S (1995): Cloning of HindIII digested bovine herpesvirus-1 DNA fragments from an Indian respiratory isolate. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 35: 167-175.
34. Hage, J. J.; Glas, R. D.; Westra, H. H.; Maris-Veldhuis, M. A.; Van Oirschot, J. T. y Rijsewijk, F. A. M. (1998) : Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Vet. Microbiol.* 60(2-4): 87-98.
35. Hodgson, P. D.; Aich, P.; Manuja, A.; Hokamp, K.; Roche, F. M.; Brinkman, F. S. L.; Potter, A.; Babiuk, L. A. y Griebel, P. J. (2005): Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comp. Funct. Genom.* 6:244-250.
36. Jones C. (2003): Herpes simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 79-95.
37. Jones, C.; Geiser, V.; Henderson, G.; Jiang, Y.; Meyer, F.; Pérez, S. y Zhang, Y. (2006). Functional analysis bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 113 (3-4): 199-210.
38. Jones, C.; Newby, T.; Holt, T.; Doster, A.; Stone, M.; Ciacci-Zanella, J.; Webster, C. y Jackwood, M. (2000): Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). *Vaccine.* 18: 3185-3195.
39. Kaashoek, M. J.; Rijsewijk, F. A.; Ruuls, R. C.; Keil, G. M.; Thiry, E.; Pastoret, P. P. y Van Oirschot, J. T. (1998): Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine.* 16: 802-809.
40. Kibenge, F. S. B.; Harris, L. M.; McKenna, P. K.; Wadowska, D. y Yason, C. V. (1994): Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am. J. Vet. Res.* 55(9): 1206-1212.
41. Leary, T. P. y Splitter, G. A. (1992): Infectious bovine rhinotracheitis. In: Castro, A. E, Houschele, W. P., eds. *Veterinary Diagnostic Virology*. St. Louis: Mosby Year Book. 103-106.
42. Lemaire, M.; Meyer, G.; Baranowski, E.; Schynts, F.; Wellemans, G.; Kerkhofs, P. y Thiry, E. (2000): Production of Bovine Herpesvirus Type 1-Seronegative Latent Carriers by Administration of a Live-Attenuated Vaccine in Passively Immunized Calves. *J. Clin. Microbiol.* 37(11): 4233-42387.
43. Lemaire, M.; Pastoret, P. y Thiry, E. (1994). Le controle de l' infection par le virus de la rhinotracheitis infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.* 138: 167-180.
44. Lesko, J.; Veber, P.; Hrdá, M. y Feketeová, M. (1993): Large-scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers. *Acta Virol.* 37: 73-78.
45. Leutenegger, C. M. (2001): The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Veterinary Sciences Tomorrow.* 1: 1-15.
46. Lovato, L.; Inman, M.; Henderson, G.; Doster, A. y 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. *J. Virol.* 77 (8): 4848-4857.
47. Mackay, I. M. (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(3): 190-212.
48. Manual de la OIE (2004a): Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. Capítulo 2.3.5. In: *Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccine 2004, 5^{ta} edición*, Office International des Epizooties.
49. Manual de la OIE (2004b): Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Capítulo. 1.1.4. In: *Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccine 2004, 5^{ta} edición*, Office International des Epizooties.
50. Mars, M. H.; de Jong, M. C.; van Maanen, C.; Hage, J. J. y Van Oirschot, J. T. (2000a): Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet. Microbiol.* 76: 1-13.

51. Mars, M.; de Jong, M. y van Oirschot, J. (2000b): A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine*. 18: 1975-1981.
52. Martín, J.; Ruíz Villamor, E.; Donoso, S.; Quesada, M.; Lecoq, C.; y Sierra, M. A. (1997): Immunohistochemical detection of cholera viral glycoprotein 55 in parafina embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest* 9: 10-16.
53. Masri, S. A.; Olson, W.; Nguyen, P. T.; Prins, S. y Deregt, D. (1996): Rapid Detection of Bovine Herpesvirus 1 in the Semen of Infected Bulls by a Nested Polymerase Chain Reaction Assay. *Can. J. Vet. Res.* 60: 100-107.
54. Mena, A.; Ioannou, X. P.; Van Kessel, A.; Van DrunenLittle-Van Den Hurk, S.; Popowych, Y.; Babiuk, L. A. y Godson, D. L. (2002): Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR. *J. Immunol. Methods*. 263(1-2): 11-21.
55. Mettenleiter, T. C. (2004): Budding events in herpesvirus morphogenesis. *J. Virus Res.* 8(13).
56. Metzler, A. E.; Matile, H.; Gassmann, U.; Engels, M. y Wyler, R. (1985): European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 85: 57-69.
57. Meurens, F.; Schynts, F.; Keil, G. M.; Muylkens, B.; Vanderplasschen, A.; Gallego, P. y Thiry, E. (2004): Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 78: 3872-3879.
58. Moore, S.; Gunn, M. y Walls, D. (2000): A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.* 75: 145-153.
59. Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. (1999): *Veterinary Virology*, Third Edition.
60. Muylkens, B.; Meurens, F.; Schynts, F.; de Fays, K.; Pourchet, A.; Thiry, J.; Vanderplasschen, A.; Antoine, N. y Thiry, A. (2006): Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet. Microbiol.* 113: 283-291.
61. Niesters, H. G. (2001): Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 25(4): 419-429.
62. Noda, J. y Barrera, M. (1985): Efecto de la temperatura, éter y tripsina sobre cepas de herpesvirus bovino tipo 1. *Rev. Salud Anim.* 7: 19-27.
63. Noda, J. y Barrera, M. (1986): Caracterización de una cepa atenuada de herpesvirus bovino tipo 1. I- Comportamiento frente a agentes físicos y químicos. *Rev. Salud Anim.* 8: 129-134.
64. Obando, C. A. R. (1994): Problemas Respiratorios, entéricos y reproductivos en ganado bovino, ocasionados por virus. *Fonaiap Divulga.* 45: 1-7.
65. Pérez, S.; [Inman, M.](#) y [Doster, A.](#) (2005): Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 43(1): 393-401.
66. Pico, M. C. B.; Giralдино, I. G. F y Otero, A. G. (1997): *Inmunología Experimental*. (Ed) Félix Varela. Capítulo V: Inmunoensayos Enzimáticos. 199-225.
67. Pidone, C. L.; Galosi, C. M. y Etcheverrigaray, M. E. (1999): Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 19(112): 40-50.
68. Pompeo, M. C.; Alfieri, A. F.; Valadares, A. F. F.; Rezler, S. W.; Médici, K. C. y Alfieri, A. A. (2005): Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods* 128: 183-188.
69. Puntel, M.; Fondevila, N. A.; Viera, J. B.; O'Donnell, V. K.; Marcovecchio, J. F.; Carrillo, B. J. y Schudel, A. A. (1999): Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *J. Vet. Med.* 46(3): 157-161.
70. Rijsewijk, F. A.; Kaashoek, M. J.; Langeveld, J. P.; Meloen, R.; Judek, J.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Maris-Veldhuis, M. A. y Van Oirschot, J. T. (1999): Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology* 80: 1477-1483.

71. Rodríguez, I. P. S. y Barrera, H. A. S. (2004): La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 7(3): 323-335.
72. Roizman, B. y Pellett, P. E. (2001): The family Herpesviridae: A brief introduction . in.: Knipe, D. M. y Howley, P. M. (Eds), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams y Wilkins publishers, Philadelphia. 2381-2398.
73. Rola, J.; Larska, M. y Polak, M. P. (2005): Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull Vet. Inst. Pulawy*. 49: 267-271.
74. Ros, C.; Riquelme, M. E.; Öhman Forslund, K. y Belák, S. (1999): Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods* 83: 55-65.
75. Rouhander, H.; Brinkman, M. L. y Sells, L. L. (1967): Reactivation of ether inactivated IBR virus. *J. Inf. Dis.* 117: 237-241
76. Sánchez, G. T.; Benito, A. Z. y Rivera, H. G. (2003). Seroprevalencia del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Ganado Lechero del Valle de Lima. *Rev. Investig. Vet. Perú*. 14(1):1-5.
77. Satz, M. L. y Kornblihtt, A. R. (1993): La Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Ciencia Hoy*. 4(23): 1-4.
78. Schmitt, B. y Henderson, L. (2005): Diagnostic tools for animal diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24(1): 243:250.
79. Schynts, F.; Baranowski, E.; Lemaire, M. y Thiry, E. (1999): A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.* 66(3): 187-195.
80. Smits, C. B.; Van Maanen, C.; Glas, R. D.; De Gee, A. L. W.; Dijkstrab, T.; Van Oirschot, J. T. y Rijsewijk, F. A. M. (2000): Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods* 85: 65-73.
81. Spilki, F. R.; Esteves, P. A.; D' Ávila da Silva, A.; Franco, A. C.; Rijsewijk, F. A. M. y Roehe, P. M. (2005): A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J. Virol. Methods*. 129(2): 191-193.
82. Straub, O. C. (2001): Advances in BHV-1 (IBR) research. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 108(10): 419-422.
83. Suresh, S.; Gunaseelan, L.; Kumanan, K. y Manorama Dhinakaran. (1992): A modified passive haemagglutination test for the detection of bovine herpesvirus 1 antibodies in bovines. *Cheiron* 21: 137-141.
84. Suresh, S.; Kumanan, K.; Manorama Dhinakaran; Padmanaban, V. D. y Raghavan, N. (1993): Growth characteristic of bovine herpesvirus-1. *Indian Vet. J.* 70: 204-206.
85. Takiuchi, E.; Médici, K. C.; Alfieri, A. F. y Alfieri, A. A. (2005): Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res. Vet. Sci.* 79: 85-88.
86. Thiry, J.; Keuser, V.; Muylkens, B.; Meurens, F.; Gogev, S.; Vanderplasschen, A. y Thiry, E. (2006a): Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 37: 1-22.
87. Thiry, J.; Tempesta, M.; Camero, M.; Tarsitano, E.; Bellacicco, A. L.; Thiry, E. y Buonavoglia, C. (2006b): A live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vet. Microbiol.* 113: 303-308.
88. Torres, M. H. (1997): Diagnóstico de infecciones con técnicas de biología molecular. *Boletín de la Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile.* 26(3): 1-4.
89. Van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2006): Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 113: 275-282.
90. Van Engelenburg, F. A. C.; Maes, R. K.; Van Oirschot, J. T. y Rijsewijk, F. A. M. (1993): Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. *J. Clin. Microbiol.* 31(12): 3129-3135.

91. Van Engelenburg, F. A. C.; Van Schie, F. W.; Rijsewijk, F. A. M. y Van Oirschot, J. T. (1995): Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in Semen Is Detected Much Longer by PCR than by Virus Isolation. *J. Clin. Microbiol.* 33(2): 308-312.
92. Van Oirschot, J. (1995): Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief. *Veterinary Quartely.* 17: 29-33.
93. Voet, D. y Voet, J.G. (2004): Biochemistry, 3^{ra} edición. John Wiley & Sons Inc. Chapter 5: Nucleic Acids, Gene Expression, and Recombinant DNA Technology. Pág: 80-126.
94. Wentink, G. H.; Van Oirschot, J. T. y Verhoeff, J. (1993): Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV1). *Veterinary Quarterly.* 15: 30-33.
95. Wiedman, M.; Brandon, R.; Wagner, P.; Dubovi, E. y Batt, C. A. (1993): Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR. *J. Virol. Methods.* 44: 129-140.
96. Williams, S. D. y Kwok, S. (1992): Polymerase chain reaction: applications for viral detection. In: Lenette, E. H. (ed.). Laboratory Diagnosis of Viral Infections, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 147-174.
97. Winkler, M.; Doster, A. y Jones, C. (2000a): Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 74: 5337-5346.
98. Winkler, M.; Schang, L.; Doster, A.; Holt, T. y Jones, C. (2000b): Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *Journal of General Virology.* 81: 2993-2998.
99. Xia, J. Q.; Yason, C. V. y Kibenge, F. S. (1995): Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.* 59(2): 102-109.
100. Yason, C. V.; Harris, L. M.; McKenna, P. K.; Wadowska, D. y Kibenge, F. S. B. (1995). Establishment of Conditions for the Detection of Bovine Herpesvirus-1 by Polymerase Chain Reaction Using Primers in the Thymidine Kinase Region. *Can. J. Vet. Res.* 59: 94-101
101. Zacarías, E. A. R. (2002): Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marco. Universidad del Perú. Lima- Perú.*

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesinas, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> o en desde **RECVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por correo electrónico solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® (Copyright) 1996-2008 E_mail: info@veterinaria.org