

AI SLAMIENTO DEL VIRUS HERPES BOVINO TIPO 1 EN BOVINOS DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA - COLOMBIA

ISOLATION OF BOVINE HERPES VIRUS TYPE 1 FROM CATTLE IN CORDOBA - COLOMBIA

Victor Vera A,¹ Ph.D, César Betancur H,^{2*} M.Sc.

¹ Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá, Colombia, ²Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Pecuarias. Grubiodeq. Montería, Córdoba. *Correspondencia: betanci@yahoo.com

Recibido: Julio 29 de 2008; Aceptado: Noviembre 4 de 2008

RESUMEN

Objetivo. Realizar el aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 (BHV-1) en ganado bovino con antecedentes de infertilidad. **Materiales y métodos.** A partir de 85 animales, provenientes de diferentes áreas rurales del departamento de Córdoba, Colombia, sin antecedentes de vacunación y con títulos neutralizantes contra la enfermedad de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) por seroneutralización, se escogieron dos toros y una vaca para hacer aislamiento de HVB-1. Los animales fueron inmunosuprimidos con Dexametasona, y se obtuvieron muestras con hisopos nasales, oculares y de lavado prepucial en los toros y vaginales en la vaca respectivamente. **Resultados.** Se observó un efecto citopático a las 3 horas después de la inoculación de las células MDBK con el lavado genital de la vaca y a las 24 horas en los toros, con exposición del efecto en "racimo" a las 48 horas. El aislamiento en ambos tipos de muestras, sugiere que la reactivación viral fue seguida por una fase de viremia y excreción del virus en las secreciones naturales. **Conclusiones.** El aislamiento del virus HVB-1 en los reproductores aparentemente sanos pero con títulos a la prueba de seroneutralización, establece la presencia de latencia viral en éstos animales, importante factor epidemiológico en la difusión de la enfermedad a nivel de campo. Se deben iniciar los estudios necesarios para establecer el subtipo de virus actuante en el campo, para conocer sus características antigénicas y su correspondencia con las cepas vacunales.

Palabras clave: Rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), virus herpes, bovino, Colombia.

ABSTRACT

Objective. Bovine herpes virus type 1 (BHV-1) was isolated from beef cattle with history of infertility. **Materials and methods.** We chose 85 unvaccinated animals, from different rural areas of Cordoba Department that had evidence of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by serum neutralization. Two bulls and one cow were chosen to attempt isolation of HVB-1. The three bovines were immunosuppressed with glucocorticoids (dexamethasone) and samples of prepuccial washing (males) vaginal washing (female), and nasal and ocular swabs were obtained. **Results.** Cytopathic effect was detected 3 hours post-inoculation in the MDBK cells inoculated with vaginal washing of the cow and 24 hours post-inoculation in the cells inoculated with washings from the bulls. A "racime effect" appeared after 48 hours. Successful isolation from both types of samples, suggests that viral reactivation was followed by viremia and shedding of virus in natural secretions and excretions. **Conclusions.** The isolation of BHV-1 from apparently normal reproductive animals confirms the presence of viral latency in these animals. Latency is an important epidemiological factor in the spread of the disease among farm animals. Studies should be initiated to identify the viral subtype circulating understand its antigenic characteristics and match the virus to a vaccine strain.

Key words: Infectious bovine rhinotracheitis (IBR), herpes virus, bovine, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es ocasionada por el herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), clasificado dentro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfa-herpesvirinae*, posee cubierta lipídica, capsida icosaédrica y ácido nucleico ADN (1). Múltiples copias de su ADN viral pueden permanecer como episomas integrados al genoma celular de las neuronas de los ganglios nerviosos en donde establecen infecciones latentes (2).

Mediante análisis por enzimas de restricción se han descrito 3 subtipos de BHV-1: el subtipo BHV-1.1 y BHV-1.2.a, representan cepas que causan enfermedad respiratoria; BHV-1.2.b cepas genitales; BHV-1.3.a y BHV-1.3.b, para la forma encefálica. El BHV-1.3 actualmente se clasifica como subtipo 5 (3). Dentro de las infecciones producidas por el BHV-1 se reconocen diferentes formas clínicas, la respiratoria (IBR) es de la mayor presentación y causante de infertilidad, mortalidad embrionaria y aborto (4).

La forma genital conocida como IPV o IPB es una infección venérea caracterizada por infertilidad temporal (4,5), la forma encefálica descrita como una enfermedad

altamente mortal en terneros (6). Otras presentaciones incluyen dermatitis, mastitis y metritis (7,8).

El diagnóstico de la infección por el HVB-1 se basa en sus distintas formas de presentación y requiere valoración especial en el reproductor por diversas causas: el riesgo de transmisión de la enfermedad a fincas libres, con la subsecuentes presentación epidémica; el estado de latencia viral que conlleva que los animales infectados permanezcan como portadores de por vida y la frecuente reactivación viral por estrés en condiciones naturales con eliminación del virus (9).

La literatura es amplia en describir cuadros respiratorios y genitales por este virus en toros de centros de inseminación artificial (7,10,11). Suiza, país que se encontraba en la fase final de erradicación de IBR sufrió una ree infección por semen contaminado (12). Por esta razón, las legislaciones sanitarias de muchos países han adoptado drásticas medidas con el objeto de reglamentar la comercialización internacional de semen y embriones (13).

La preservación de embriones infectados con el HVB-1 ofrece un riesgo potencial a receptoras seronegativas ya que se ha confirmado que el virus se adhiere firmemente a la zona pelúcida y después de sucesivos lavados puede vehiculizar al virus. (14)

En Colombia se han llevado a cabo varios intentos de aislamiento del virus IBR, muchos de los cuales han resultado infructuosos por métodos convencionales empleados (15). No obstante, se han aislado virus de IBR, que han servido para corroborar la presencia de actividad viral. Los aislamientos se han realizado a partir de animales inmunosuprimidos, por presentar periodos de viremia relativamente cortos, lo cual hace difícil su aislamiento en condiciones normales de campo (16,17). El aislamiento del virus se considera de vital importancia para establecer la variabilidad entre cepas y su correlación con los sistemas de prevención que actualmente se emplean para controlar la enfermedad (15). El objetivo de este trabajo fue realizar el aislamiento del BHV-1 en ganado bovino con antecedentes de infertilidad en el departamento de Córdoba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El desarrollo experimental del presente estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad de Córdoba sede Berástegui, municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba, Colombia; y en el laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Materiales de campo

Bovinos evaluados. Este trabajo se basó en una investigación preliminar sobre un estudio seroepidemiológico en IBR realizado en Montería, Córdoba, Colombia (18) donde se encontró un 74.7% de animales positivos. De acuerdo con los resultados serológicos obtenidos, se seleccionaron 85 animales en 22 fincas, que siendo positivos aún estaban en las fincas estudiadas. A estos animales de les realizó la prueba de seroneutralización y de éstos se escogieron 3 bovinos (2 machos y una hembra) que además de presentar títulos

altos al virus de IBR, tenían antecedentes clínicos reproductivos.

Bovinos inmunosuprimidos. De las 22 fincas evaluadas para seroneutralización se seleccionaron dos hatos, uno que pertenecía a una institución oficial y el otro a un ganadero de la región. Del hato de la institución educativa se seleccionó un toro y una vaca de raza Cebú, con 3 y 4 años de edad respectivamente y de la finca de carácter comercial un toro Jersey de 5 años de edad para ser inmunosuprimidos de manera experimental.

Materiales de laboratorio

Cepas virales. Para la realización de las pruebas de seroneutralización, se utilizó la cepa de referencia Iowa, obtenida de la ATCC (USA) y conservada a -80°C.

Controles de la prueba serológica. Se emplearon sueros policlonales bovinos positivos al BHV-1 provenientes de campo, con títulos superiores a 1:128 a la prueba de seroneutralización y sueros bovinos negativos al BHV-1 por seroneutralización.

Células bovinas. Se emplearon cultivos de células de la línea de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) (ATCC CCL 22), libres de virus de la Diarrea Viral Bovina biotipo no citopático (VDVB-NCP).

Métodos de campo

Inmunosupresión. Los 3 bovinos seleccionados fueron aislados e inmunosuprimidos con corticoides, siguiendo el esquema propuesto por Whestone et al (19). Durante 5 días se aplicaron 40 mg de dexametazona/día (Aziium®), vía intramuscular (IM); 24 h después de la última inoculación, se tomaron muestras de secreciones nasales, oculares, vaginales y prepuciales que se suspendieron en 5 ml de suero fetal bovino.

Métodos de laboratorio

Cultivo celular. Las células MDBK se mantuvieron en crecimiento por 24 horas a 37°C en medio esencial mínimo (MEM)

(SIGMA^R) suplementado con suero bovino fetal al 7% (Laboratorios Hyclone^R), L glutamina 1% (SIGMA^R) y antibióticos al 1% (solución de penicilina 10.000U, streptomina 10 mg, anfotericina 25 mg Hibrimax SIGMA^R). Las células se incubaron con el medio hasta obtener confluencia celular del 70 a 90% (20).

Inoculación del cultivo celular. Las muestras de lavado prepucial y vaginal y los hisopos nasales y oculares de los animales inmunosuprimidos, fueron transportadas en PBS, hasta el laboratorio de virología del posgrado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, donde fueron centrifugadas a 5000 rpm, 30 min a 4°C (Centrifuga Beckman J21) y diluido el sobrenadante (1:2 y 1:4) y posteriormente cada uno de los sobrenadantes fue absorbido (0.5 ml) durante 1 hora a 37°C en las células MDBK cultivadas en frascos T25, al que posteriormente se adicionó MEM al 2% y se incubó a 37°C. Cuando el efecto citopático en las células fue del 80-100%, el sobrenadante de las mismas se clarificó, centrifugándolo a 15000g (Centrífuga Beckman J21) por 20 min., a 4°C y se conservó a -80°C.

Titulación del virus de campo (DI 50). Las células confluentes de MDBK se desprendieron con tripsina al 0.25% para obtener 10 ml de células en MEM al 2%, a una concentración de 500.000 cel/ml. Por otro lado, se hicieron diluciones en base 10 del sobrenadante del cultivo con efecto citopático (virus aislado) en PBS estéril. En caja de 96 pozos, se adicionaron en cada pozo 50 ml de MEM 2%. Se adicionaron 50 ml de cada dilución del virus (columna 1 dilución 10⁻¹, columna 2 dilución 10⁻², etc.). En todos los pozos se adicionó 50 ml de las células MDBK previamente preparadas (500.000 cel/ml). La columna 12 de la placa se usó como control de células colocando 100 ml de MEM al 2% y 50 ml de células MDBK. En sistema cerrado se incubó a 37°C por 72 h. Se observaron las placas en un microscopio invertido y con la lectura del efecto citopático producido en cada una de las réplicas de cada una de las diluciones del virus se aplicó el método de Reed y Muench (21).

Prueba de seroneutralización para los 3 bovinos muestreados dentro del estudio poblacional. Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por Betancur et al (18), los cuales se comprobaron para los 3 bovinos seleccionados en el presente trabajo por seroneutralización.

Para evaluar presencia del BHV-1 en cultivos infectados. Se empleó el método: suero constante, virus diluido, para evaluar la concentración viral de los diferentes aislamientos obtenidos. La prueba se realizó en caja de microtécnica de 96 pozos y empleó un suero bovino positivo al virus de IBR con un título 1:128 a la prueba de seroneutralización. De manera breve: se colocaron 50 µl de medio de cultivo suplementado (glutamina 2%, solución de antibióticos al 1%) y 50 µl de los sobrenadantes del cultivo previamente infectado en la fila A y en la fila H. Se realizaron diluciones en base 2 de cada uno de los sobrenadantes hasta la dilución 1:128 (fila G); dejando la fila H como control de la muestra. Se adicionaron 50 µl del suero bovino con título 1:128 (dilución de trabajo) en la fila H (control de sueros). Se hicieron los correspondientes controles para células y para suero bovino y se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se colocaron 50 µl de células suplementadas (25.000 células/50 µl) (500.000 células/ml) en todos los pozos de la caja. Las cajas se sellaron e incubaron a 37°C por 72 h. La lectura se llevó a cabo en microscopio invertido, determinándose el título seroneutralizante para cada uno de los sobrenadantes sospechosos al virus de IBR, previa verificación del resultado de los controles empleados en la prueba.

RESULTADOS

La prueba de seroneutralización presentó títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:5 a 1:320 (18). El toro y la vaca Cebú del ható de la institución educativa presentaron títulos de 1:160 y el toro Jersey de la finca de carácter comercial títulos de 1:320; resultados confirmados en el laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Durante el tiempo de inmunosupresión no se evidenció deterioro en la salud de los animales a pesar del posible riesgo de contraer infecciones, dado que los 3 bovinos fueron aislados dentro de las instalaciones de la sede en Berastegui de la Universidad de Córdoba.

Inoculación de las muestras provenientes de animales inmunosuprimidos. Las células de la línea MDBK utilizadas para la propagación y análisis del título viral y pruebas de seroneutralización, lograron confluencia del 80 a 100% a las 24 horas con MEM al 7-10% en frascos T75 (Figura 1), las que además sirvieron para lograr el aislamiento viral y observar el efecto citopático (EC) producido por el virus (Figura 2).

La observación microscópica del cultivo de las diferentes cepas del virus se llevó a cabo cada hora durante 18 horas y posterior observación con tiempos más extendidos.

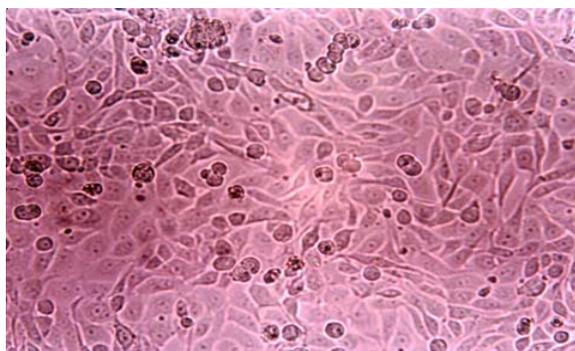


Figura 1. Cultivo celular confluyente de MDBK, antes de inoculación con las muestras sospechosas al virus HVB-1.

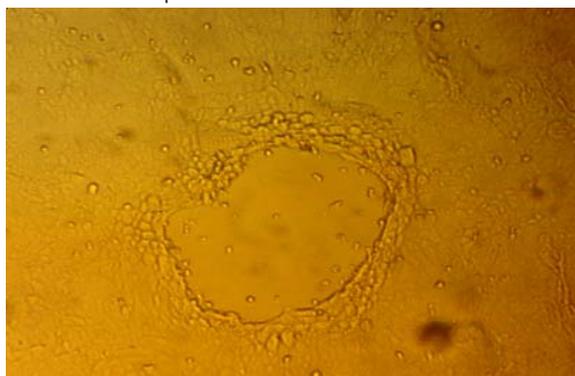


Figura 2. Primer efecto citopático a las 3 horas después de la inoculación de las células MDBK con el lavado genital de la vaca. (10 X)

Los cultivos celulares inoculados con las muestras provenientes de los lavados genitales del primer toro y la vaca, presentaron una aparición de efecto citopático transcurridas tres horas de inoculación (Figura 2), con exposición del efecto en "racimo" a las cuatro horas y media. Pasadas seis horas, se efectuó disrupción celular por congelación y descongelación a $-70^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$, por tres veces, con el objeto de liberar más virus al medio de cultivo; el sobrenadante se centrifugó a 4.500xg por 1 hora a 4°C (Bekcman J2-21) y se efectuaron nuevos pases en cultivo celular de MDBK.

El efecto citopático de la muestra del lavado genital del toro dos, presentó una aparición de efecto citopático a las 24 h de inoculación, con exposición del efecto en "racimo" a las 48 h. El cultivo celular inoculado con la muestra de la vaca presentó el efecto citopático de forma más rápida, puesto que transcurridas las 24 h ya había un desprendimiento del 80% de la monocapa celular.

Los cultivos celulares inoculados con las muestras provenientes de los hisopos nasales y oculares de ambos toros, presentaron una aparición de efecto citopático transcurridas 24 h de inoculación, con exposición del efecto en "racimo" a las 48 h. El cultivo celular inoculado con la muestra de lavado prepucial del toro dos presentó el efecto citopático de forma más rápida, ya que transcurridas las 24 h hubo un desprendimiento del 80% de la monocapa celular (Figura 3). Al cabo del tiempo de incubación de cada muestra se efectuó disrupción celular por congelación y descongelación a $-70^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$, por tres veces, con el objeto de liberar más virus al medio de cultivo; el sobrenadante se centrifugó a 4.500xg por 1 hora a 4°C (Bekcman J2-21) y se efectuaron nuevos pases en cultivo celular en células MDBK. En la figura 3 se observa el EC, que consistió en redondeamiento y agrupamiento de las células en forma de racimos, acompañado de un aumento de la granularidad, reducción del tamaño celular y daño en la continuidad de la monocapa.

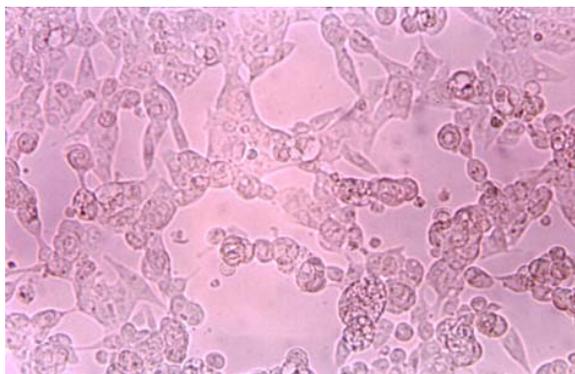


Figura 3. Efecto citopático del IBR en células MDBK, transcurridas 24 horas de la inoculación.

Titulación del virus de campo (DI₅₀). Los virus aislados de los 3 bovinos inmunosuprimidos que presentaron EC compatible con el BHV-1, fueron titulados una vez se comprobó su adaptación a las células MDBK, a través de producir EC de la monocapa por encima del 80%, lo que se manifestó entre el segundo al tercer pasaje, observándose un mayor título DI₅₀ en las cepas de campo proveniente de los lavados prepuciales y vaginal, similar al título de la cepa de referencia Iowa, en contraste con los aislamientos de secreción nasal y ocular, que tuvieron un orden de magnitud menor a los anteriores (Tabla 1).

Tabla 1. Titulación de las diferentes cepas aisladas del virus IBR al inicio del efecto citopático.

CEPA VIRUS	TÍTULO DI ₅₀
IOWA (referencia)	$1 \times 10^{-5.25}$
Hisopos nasales, toro 1	$1 \times 10^{-4.5}$
Hisopos nasales, toro 2	$1 \times 10^{-4.5}$
Hisopos oculares toro 1	$1 \times 10^{-4.2}$
Hisopos oculares toro 2	$1 \times 10^{-4.2}$
Lavado prepucial toro 1	$1 \times 10^{-5.15}$
Lavado prepucial toro 2	$1 \times 10^{-5.15}$
Lavado vaginal	$1 \times 10^{-5.62}$

Prueba de neutralización para evaluar presencia del BHV-1 en cultivos infectados. Todas las cepas virales dieron capacidad de neutralización, frente al suero bovino positivo a BHV-1, aunque en diferentes diluciones, estableciéndose títulos neutralizantes para las muestras tomadas

de tracto reproductivo, tanto de la hembra como de los machos, sin llegar a alcanzar los títulos obtenidos con la cepa Iowa (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de la capacidad de neutralización de las diferentes cepas aisladas del virus de IBR (BHV-1) frente a sueros bovinos provenientes de animales positivos a BHV-1 en células MDBK.

CEPA VIRUS	TÍTULO NEUTRALIZANTE
IOWA (referencia)	0.130555556
Hisopos nasales, toro 1	01:16
Hisopos nasales, toro 2	01:16
Hisopos oculares toro 1	01:04
Hisopos oculares toro 2	01:02
Lavado prepucial toro 1	0.086111111
Lavado prepucial toro 2	0.086111111
Lavado vaginal	0.086111111

DISCUSIÓN

El resultado preliminar de la evaluación serológica para detección de anticuerpos a BHV-1, en diferentes zonas rurales del departamento de Córdoba, permitió establecer la existencia de actividad viral, lo cual confirmó la presencia del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa en el área de estudio, al igual que lo reportado serológicamente para otras regiones ganaderas del país (22-24).

El aislamiento del BHV-1 en tres animales diferentes, de dos granjas de la región, permitió comprobar la presencia del virus de IBR, en el departamento de Córdoba.

Los resultados obtenidos a nivel de laboratorio como el efecto citopático en células MDBK compatible con BHV-1, titulación del virus y prueba de neutralización viral con el método de virus diluido suero positivo constante, son contundentes para afirmar que todas las cepas aisladas corresponden a BHV-1. Reportes en la literatura científica demuestran aislamientos de BHV-1, con algunas de las características antes

mencionadas (16,25). Es importante realizar la posterior subtipificación por PCR-RFLP de las cepas reportadas en el presente estudio.

La metodología aquí seguida para el aislamiento viral, fue la misma empleada en los aislamientos realizados por Góngora et al (25) y Chaparro et al (16) basada en la reactivación de la latencia viral, presente en IBR.

El aislamiento de BHV-1 en reproductores normalmente sin sintomatología de IBR, igualmente permite establecer que bovinos con serología positiva y en estados de estrés, pueden convertirse en fuente de infección para animales en contacto. La prueba con corticoides se ha propuesto como la medida más segura para descartar infecciones latentes en toros portadores a los cuales se les quiere congelar y comercializar el semen (26).

En los aislamientos realizados en el presente estudio, se logró establecer, que no sólo el virus es eliminado por el tracto reproductivo, sino que también lo hace por vía respiratoria, siendo probablemente la genital, la vía de mayor capacidad infecciosa, de acuerdo con lo observado a nivel de la infección en las células MDBK. Este aislamiento sugiere que la reactivación viral fue seguida por una fase de viremia y excreción del virus en las secreciones naturales. Otra posibilidad es que el virus haya estado latente por infecciones de tipo respiratorio o genital adquiridas previamente y que su localización estaba relacionada con la primoinfección, tal como lo señalaba Whestone et al (19), donde igualmente reportan el aislamiento de dos virus que en forma latente infectan el mismo ganglio o ganglios diferentes.

El comportamiento de los virus en los cultivos celulares, fue diferente, mostrando una mayor capacidad de daño celular los virus provenientes del tracto genital que los del respiratorio, así como un mayor título (DI50%), lo que necesariamente implica su caracterización molecular para establecer si son cepas diferentes (19).

El aislamiento de BHV-1, en la región ganadera de Córdoba, se torna en una importante herramienta para el manejo de la enfermedad, dado que es el paso inicial para establecer diferencias moleculares que pueden repercutir en el reconocimiento de la distribución por regiones de subtipos del virus y para establecer si las cepas vacunales, protegen contra estas cepas de campo. Similar ha sucedido con los aislamientos realizados en los últimos 15 años en la Sabana de Bogotá (25) y en San Martín Meta (16), donde inicialmente se observó un efecto citopático compatible con BHV-1 pero indiferenciable entre cepas de campo y de referencia como en el presente estudio. Sin embargo, con pruebas moleculares (PCR-RFLP), presentaron diferencias, como se dieron para estos dos aislamientos, donde se estableció la presencia del subtipo BHV-1.2a y BHV-1.1 respectivamente para las regiones en mención(27).

Está demostrado que un paso inicial para el manejo de IBR es el aislamiento de cepas de campo. Navarrete et al (28), produjeron anticuerpos monoclonales específicos a la cepa de campo aislada en la Sabana de Bogotá (25) y desarrollaron una prueba de Elisa para su diagnóstico.

Aunque existe cierto escepticismo sobre el carácter patógeno del virus de IBR, se ha comprobado de manera experimental, la reproducción de la enfermedad a partir de propiciar la infección en bovinos negativos con una cepa de BHV-1, obtenida de un aislamiento de campo (29).

Es importante realizar pruebas sobre el genoma viral de las cepas aisladas, que permitan conocer a cuál(es) subtipo(s) pertenecen y realizar otros aislamientos en otras zonas del departamento de Córdoba, para hacer comparaciones entre las cepas regionales y las reportadas a nivel nacional, de acuerdo a lo recomendado por Vera et al (15).

En conclusión, el aislamiento del virus HVB-1 en los reproductores aparentemente sanos pero con títulos a la prueba de seroneutralización, establece la presencia de latencia viral en éstos animales, importante

factor epidemiológico en la difusión de la enfermedad a nivel de campo. Se deben iniciar los estudios necesarios para establecer el subtipo de virus actuante en el campo, con el fin de conocer sus características antigénicas y su correspondencia con las cepas vacunales.

Agradecimientos

A la Dra. Bibiana Riaño y al Dr. Diego Piedrahita del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, por el apoyo en la recolección y procesamiento de las muestras. A la Universidad de Córdoba.

REFERENCIAS

- Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication *Vet Microbiol* 2006; 113:293-302.
- Hammerschmidt W, Lurz R, Ludwig H, Buhk HJ. Recombination of genomic terminus of bovine herpesvirus-1 with cellular DNA. *J Gen Virol* 1990; 71:2043-2051.
- Roizman B. The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol* 1992; 123:432-445.
- Miller JM. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet Med* 1991; 86:95-98.
- Zapata J., Ossa J., Bedoya, Zuluaga F. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización molecular de una cepa de Herpes Bovino 1. *Rev Col Cienc Pec* 2002; 15:92-99.
- George LW. Understanding the encephalitic form of infectious bovine rinotracheitis. *Food Anim Pract* 1991; 335-337.
- Bwagamo O, Kaminjolo JS. Isolation of IBR/IPV virus from semen and skin lesions of bulls at Kabete, Kenya. *Zentralb Veterinarmed* 1971; 18:262-269
- Lomba F, Bienfet V, Wellemans G. IBR virus and occurrence of metritis at parturition in the bovine Belgian blue white breed. *Br Vet J* 1976; 132:178-181
- Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Van Oirschot JT. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Microbiol* 1996; 53:103-110.
- Van Oirschot J, Straver P, Van Lieshout J, Quak J, Westenbrink F, Van Exsel A. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 1993; 132:32-35.
- Vogel FS, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Moraes MP, Braganca JF. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2). *Vet Microbiol* 2004; 98:185-196.
- Kupferchmied H, Kihm U, Bachmann P, Muller KH, Ackermann M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology* 1986; 25(3):439-443.
- Thielscher HH, Wilhelm HF. IBR/IPV: Vaccination or eradication?. *Animal Research and Development* 1987; 25:97-108.
- Bielanski A, Dubuc C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova From Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 1994;41:1211-1217.
- Vera VJ, Ramírez GC, Villamil LC, De Sandino M, Jaime J. Biología molecular, epidemiología y control de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) y de la diarrea viral bovina (DVB). 1ª ed. ISSN 0120-2952. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2006.
- Chaparro J, Ramírez G, Vera V, Góngora A, Villamil L. Aislamiento de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina de una explotación de ganado de carne en el Departamento del Meta. *Orinoquía* 2002; 6:100-107.

17. Góngora A, Villamil L, Vera V, Ramírez G, Parra J. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en IBR. *Rev Med Vet Zoot* 1995; 43:37-41.
18. Betancur C, González M, Reza L. Seroepidemiología de la rinotraqueitis infecciosa bovina en el municipio de Montería, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2006; 11(2):830-836.
19. Whestone CA, Miller JM, Bortner DM and Vander Maten MJ. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency and after superinfection in the host animal. *Arch Virol* 1989; 106:261-279.
20. Mohanty SB, Dutta SK. *Virología veterinaria*. México: Editorial Interamericana; 1983.
21. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27:493-497.
22. Griffiths IB, Gallego MI, Villamil LC. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Bogotá: ICA (ANALAC); 1982.
23. Rodas JD, Arboleda JJ, Zuluaga FN, Ossa JE. Estandarización de la técnica de ELISA para rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y determinación de la prevalencia de la infección en el ható blanco orejinegro (BON) de Antioquia. *Rev Col Cienc Pec* 1996; 9(2): 35-39.
24. Díaz F. Reactividad serológica y aspectos epidemiológicos para la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) mediante la prueba de seroneutralización viral en toros reproductores de la región central del departamento del Valle del Cauca. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; 2000.
25. Góngora A, Villamil L, Vera V, Parra J, Ramírez G, López G. Aislamiento de un Herpes Virus Bovino tipo 1 de secreción nasal y esmegma prepucial de un toro reproductor. *Rev Med Vet Zoot* 1996; 43:37-41.
26. Dennett DP, Allan JP and Jhonson RH. The use of corticosteroids to aid detection of bulls carrying infection bovine rinotracheitis virus. *Austr Vet Tour* 1973; 49:594-595.
27. Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Determinación y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de herpes bovino tipo 1. *Rev Med Vet Zoot* 2005; 120-127.
28. Navarrete J. Obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas de cepas de campo del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) y evaluación de su utilidad diagnóstica a través de la prueba de Elisa. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; 2002.
29. Chaparro JJ, Ramírez GC, Vera VJ, Villamil LC. Evaluación de la actividad patogénica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en terneros. En: Congreso Internacional. Viña del Mar, Chile: ISVEE 10-memorias; 2003.