

Infección natural de un toro con dos subtipos diferentes de Herpesvirus bovino tipo 1

Natural Infection in a Bull with Two Different Subtypes of Bovine Herpesvirus Type 1



Alonzo, P.¹, Puentes, R.¹, Benavides, U.¹, Esteves, P.A.², Silva, A.D.², Roehe, P.M.², Maisonnave, J.*

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es demostrar la infección de un mismo animal a campo, con dos subtipos diferentes de BoHV-1. En el año 1999 se diagnosticó la infección con una cepa autóctona de *Herpesvirus bovino 1* subtipo 1 (BoHV-1.1), en un toro Limousin con sintomatología nerviosa. Este bovino permaneció seronegativo hasta mayo del año 2004, momento en el que se detectan anticuerpos anti-BoHV. Se realizó una inmunodepresión farmacológica para poder reactivar y aislar el virus latente y en lugar de re-aislar la cepa Uy-1999, se aisló otra cepa de BoHV-1 perteneciente al subtipo 1.2a (Uy2004), de líquido seminal e hisopado prepucial de los días 7 a 10 post-inmunodepresión. Con una diferencia de 5 años dos cepas autóctonas de subtipos diferentes de BoHV-1 (1.1 y 1.2a) fueron aisladas de un mismo animal. Si bien se ha detectado la presencia de dos tipos o subtipos de BoHV diferentes en condiciones naturales, no existen comunicaciones sobre aislamientos de dos subtipos en un mismo animal.

Palabras clave: infección natural, *Herpesvirus* bovino 1, diferentes subtipos

SUMMARY

The objective of the present work is to communicate the natural infection of a bull with two different subtypes of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1). The two isolates, Uy-1999 (subtype 1) and Uy-2004 (subtype 2a), were recovered from the same animal, 5 years apart. After BoHV-1.1 Uy-1999 was isolated, the animal remained seronegative until five years later, when BoHV-specific neutralizing antibodies were detected. The bull was then immunosuppressed with corticosteroids, with the purpose of reactivating and attempting to recover latent virus. The BoHV-1.2 isolate (Uy-2004) was recovered from seminal fluid and prepuce swabs between days 7 and 10 post-immunosuppression; however, the isolate Uy-1999 could not be recovered. Although infections with different BoHV-1 subtypes of the same animal has been previously demonstrated experimentally, there are no reports of isolation of two different BoHV subtypes from the same animal.

Key words: natural infection, Bovine Herpesvirus 1, different subtypes,

INTRODUCCIÓN

El *Herpesvirus bovino 1* (BoHV-1) es el agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) enfermedad contagiosa de distribución mundial (Lemaire y col., 1994), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Davison, 2002). La infección con este virus puede ocasionar diferentes formas clínicas caracterizadas por enfermedad respiratoria, nerviosa y reproductiva, vulvovaginitis-pustular infecciosa (IPV) y balanopostitis-pustular infecciosa (IBP) (Tikoo y col., 1995). Si bien no se ha observado alta mortalidad su importancia radica en las pérdidas económicas que se producen por infertilidad, abortos, muerte de neonatos, caída en la producción lechera y complicaciones por enfermedades bacterianas secundarias (Miller y col., 1991).

Basados en el polimorfismo de fragmentos obtenidos utilizando enzimas de restricción (RFLP), el BoHV-1 puede clasificarse en tres subtipos diferentes: 1, 2a y 2b (D'Arce y col., 2002; Engels y col., 1981; Metzler y col., 1985; Pidone y col., 1999; Rijsewijk y col., 1999). El cuadro clínico que producen los subtipos 1 y 2a es indistinguible y ambos producen abortos, sin embargo la infección con el subtipo 2b no produce abortos y se asocia a IPV e IBP (Miller y col., 1991).

En Uruguay la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida. Un muestreo aleatorio realizado en ganado de carne a nivel

nacional encontró que 99,1% de los establecimientos ganaderos posee al menos un animal positivo y la prevalencia serológica fue estimada en 36,6% (Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008).

El BoHV-1 sobrevive en la naturaleza por dos eventos fundamentales, la infección de la población de bovinos susceptibles y la inducción de latencia en los mismos. Esta última se define como la persistencia del genoma viral en el organismo del huésped en ausencia de virus infeccioso (Pastoret y Thiry, 1985). Luego de la infección primaria el virus establece latencia y puede quedar restringido a un área local o distribuirse en órganos alejados de la puerta de entrada (Engels y Ackermann 1996; Karhs, 1987; Lemaire y col., 1994; Perez y col., 2005). El BoHV-1 puede ser reactivado y excretado bajo condiciones de estrés natural, transporte o inmunodepresión con corticoides (Thiry y col., 1987; Pastoret y col., 1982). Los bovinos latentemente infectados (asintomáticos) constituyen el reservorio más importante, ya que pueden excretar el virus de forma intermitente y transmitirlo a bovinos sanos (Engels y Ackermann 1996; Karhs, 1987; Lemaire y col., 1994; Perez y col., 2005).

Los anticuerpos específicos son detectados a los 7-10 días posinfección (pi), llegando a su título máximo entre los 14 y 35 días pi (Guy y Potgieter, 1985). Si bien existen reportes de baja o nula respuesta humoral luego de la infección por vía genital

¹Área Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

²FEPAGRO Saúde Animal-UFRGS, Brasil.

*Autor de contacto: Maisonnave, Jacqueline, Lasplaces 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay, Tel: 598-2-6281303, Fax: 598-2-6280130.

Correo electrónico: jacmaiso@gmail.com

Recibido: 18/2/2011 Aprobado: 17/11/2011

con BoHV-1, este hecho no es común cuando la infección es por vía aérea (van Oirschot, 1995). Las diferencias en la inmunogenicidad de las cepas, en la dosis y en la vía de infección, han sido reportadas como causas de una baja respuesta humoral (Kaashoek y col., 1996; Van Oirschot, 1995).

La presencia de bovinos serológicamente negativos a BoHV pero infectados latentemente ha sido reportada previamente y asociada a la detección de anticuerpos calostrales en el momento de la infección (Lemaire y col., 1994). Sin embargo, estos bovinos, luego de una infección secundaria o inmunodepresión con corticoides, desarrollan anticuerpos y respuesta celular específica anti-BoHV-1 (Lemaire y col., 2000a; Lemaire y col., 2000b).

El principal antecedente que da origen a la presente comunicación es el aislamiento a partir de secreciones nasales y oculares de una cepa autóctona de BoHV-1.1 (Uy-1999) de un toro Limousin con sintomatología nerviosa al que no se le detectaron anticuerpos pi anti-BoHV (Alonzo y col., 2002). Posteriormente, luego de una inmunodepresión con corticoides realizada en el año 2002, se demostró por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se encontraba latentemente infectado (Alonzo y col., 2002) y permaneció seronegativo. Además, entre los años 1999 a 2004 se realizó un seguimiento serológico para detectar anticuerpos específicos anti-BoHV a intervalos nunca mayores de 6 meses, con resultado negativo por neutralización (SN) *in vitro* y ELISA (Alonzo y col., 2004). En mayo del año 2004, luego de permanecer seronegativo por cinco años, se detectaron anticuerpos anti-BoHV con las mismas técnicas utilizadas anteriormente. La hipótesis planteada es que la respuesta detectada puede haber sido inducida por la reactivación de la cepa Uy-1999 (BoHV-1.1) o por una infección con otra cepa de campo. El objetivo de este trabajo es demostrar la infección de un mismo animal a campo, con dos subtipos diferentes de BoHV-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunodepresión

El toro Limousin del cual se aisló la cepa Uy-1999 BoHV-1 fue mantenido desde el año 2000 en condiciones de campo y en contacto con otros bovinos. En mayo del año 2004, luego de la detección de anticuerpos anti-BoHV, este bovino fue aislado en un box de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Uruguay. La estrategia para poder estudiar si la respuesta de anticuerpos detectada fue estimulada por una reactivación viral, fue realizar un protocolo de inmunodepresión con corticoides, para re-aislar el virus como fue descrito por Whentink y col. (1990). Brevemente, se administró Dexametasona sódica (Caliercortin®, Laboratorio Calier-España) (0,11 mg/kg), por vía intramuscular, durante 6 días consecutivos. Se tomaron muestras de sangre para evaluar anticuerpos neutralizantes anti-BoHV a los días 0, 5, 10, 14 y 45 posinmuno depresión. Para aislamiento viral se tomaron hisopados nasales, oculares, prepucciales y líquido seminal a los días 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 posinmuno depresión. Entre los días 0 y 14 se realizó una evaluación clínica que incluyó la toma de temperatura rectal,

sensorio, evaluación de mucosas y presencia de corrimientos ocular y nasal.

Análisis serológico

Se utilizó la técnica de SN *in vitro*, virus fijo-suero variable (House y Baker, 1971) para determinar anticuerpos neutralizantes anti-BoHV. Los sueros fueron evaluados por duplicado utilizando diluciones crecientes en base doble e incubados en microplacas de 96 pocillos (NUNC) por 1 hora a 37 °C con 100 dosis infectantes de cultivo celular 50 (DICC₅₀) de la cepa Los Angeles (LA) de BoHV-1.1. Seguidamente, se agregaron 3 x 10⁴ células de la línea Madin-Darb y Bovinekidney (MDBK) por pocillo y las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ por 5 días. En cada placa se realizaron controles de crecimiento celular, toxicidad del suero y se incorporaron sueros de referencia positivo y negativo (cedidos por el Dr. Weiblen de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Santa María-Brasil). El título de anticuerpos por SN *in vitro* se calculó por el método de punto final 50 y se expresó como el recíproco de la mayor dilución de suero que neutralizó al virus y fue capaz de inhibir la aparición del efecto citopático (ECP) en el 50% de los pocillos.

Aislamiento viral

Se utilizó protocolo descrito en Manual de estándares para test diagnósticos y vacunas de la Organización Mundial de Sanidad Animal (2004). Las placas de 24 pocillos (NUNC) fueron sembradas con 10⁵ células/pocillo y cuando la monocapa celular poseía un 90% de confluencia, fue inoculada con el sobrenadante de hisopados o líquido seminal dejándose en adsorción por 90 minutos a 37 °C. Se extrajo el inóculo y se agregaron 2 ml/pocillo de Minimum Essential Medium (MEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB). Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ por 6 a 7 días. Se realizaron observaciones diarias buscando la presencia del ECP característico de BoHV. Las muestras que no presentaban ECP se sometieron a tres pases ciegos antes de confirmarlas como negativas. En cada placa se incluyeron un control negativo (células + MEM) y uno positivo (células + sobrenadante de células infectadas con la cepa LA). Los aislamientos originales fueron congelados a -80 °C y posteriormente expandidos para la caracterización viral.

Identificación viral

Los cultivos que presentaban ECP característico fueron identificados con la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD) usando un anticuerpo policlonal anti-BoHV-1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD-USA). Las células se levantaron, se resuspendieron, se colocaron en porta objetos, se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ por 2 horas y se fijaron durante 10 minutos en acetona conservada a -20 °C. Las láminas luego de hidratadas y secas, se incubaron con el anticuerpo conjugado durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, se lavaron y se montaron para luego observarlas al microscopio de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Durante la inmunodepresión realizada luego de la detección de anticuerpos en mayo del año 2004 no se observaron alteracio-

Infección natural de un toro con dos subtipos diferentes de Herpesvirus bovino tipo 1

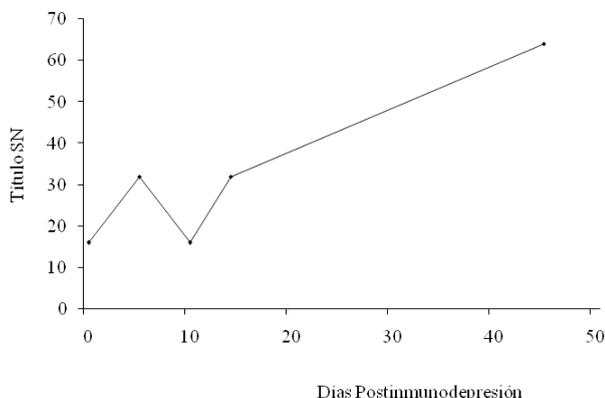


Figura 1. Evolución del título de anticuerpos neutralizantes en el toro Limousin latentemente infectado con BoHV, luego de la inmunodepresión (año 2004).

nes clínicas compatibles con la infección por BoHV-1. Posinmunodepresión se detectó un incremento en el título de anticuerpos por SN *in vitro* de 16 a 64 (Figura 1).

Los cultivos de células inoculados para aislamiento viral con el sobrenadante de los hisopados prepuciales y líquido seminal de los días 7 a 10 posinmunodepresión mostraron ECP característico de BoHV-1. La cepa aislada fue identificada como BoHV tipo 1 por IFD y denominada Uy-2004. Esta cepa fue diferente a la aislada en 1999 ya que fue caracterizada como subtipo 1.2a utilizando anticuerpos monoclonales y RFLP con la enzima *Hind III*, (Puentes y col., 2007). El resto de las muestras fueron negativas, no presentando ECP luego de tres pases consecutivos.

La secuencia de ADN que codifica la glicoproteína C en las cepas Uy-1999 y Uy-2004, aisladas del mismo animal con 5 años de diferencia, fue publicada por Esteves y col. (2008) (Acceso GenBank números: AF403051 y Z49223).

DISCUSIÓN

Desde el año 2000 el toro Limousin permaneció en contacto con otros bovinos y las muestras tomadas hasta marzo del año 2004 (mínimo cada 6 meses) para detectar anticuerpos anti-BoHV fueron negativas. En el mes de mayo, se detectaron anticuerpos anti-BoHV luego de 5 años post-aislamiento de la cepa Uy-1999 (BoHV-1.1). La posibilidad de que una reactivación de la cepa Uy-1999 o una infección con otra cepa de campo de BoHV, hayan estimulado un aumento en la generación de anticuerpos como han descrito Babiuk y col. (1996), fue evaluada mediante inmunodepresión con corticoides. Luego de la inmunodepresión del año 2004, no se re-aisló la cepa Uy-1999. Sin embargo, se aisló una segunda cepa de BoHV-1 (Uy-2004) que fue caracterizada como perteneciente al subtipo 1.2a (Puentes y col., 2007). Esto fortalece la hipótesis de que la respuesta inmune humoral detectada en mayo del año 2004 haya sido estimulada por una infección con otra cepa de campo de BoHV-1.

Las cepas autóctonas Uy-1999 (BoHV-1.1) y Uy-2004 (BoHV-1.2a) fueron aisladas del mismo bovino con 5 años de

diferencia, lo que demuestra que el toro Limousin, fue infectado naturalmente con dos subtipos diferentes de BoHV-1. La infección experimental y latencia con diferentes subtipos de BoHV-1 (intraespecífica) fue demostrada por Whetstone y Miller (1989). Sin embargo, en condiciones naturales de aislamientos de dos subtipos en un mismo animal no había sido comunicado anteriormente. La importancia de la infección con diferentes subtipos en condiciones de campo, radica en que durante la replicación viral pueden producirse recombinaciones del genoma y generar nuevas cepas o inducir modificaciones en la virulencia de las mismas (Whetstone y col., 1989a y 1989b). Este fenómeno ha sido propuesto por Thiry y col. (2006), como un importante mecanismo evolutivo de los alfa herpesvirus, ya que puede propiciar la recombinación entre diferentes tipos (interespecífica) o subtipos (intraespecífica) de BoHV (Henderson y col., 1990; Katz y col., 1990; Meurens y col., 2004). Basados en los antecedentes mencionados y en los resultados obtenidos, es posible que esto pueda estar sucediendo a nivel de campo y podría dar origen a nuevas variantes de BoHV. Por esta razón poseer aislamientos autóctonos es fundamental para poder monitorear las cepas que se encuentran circulando en nuestro país. A nivel regional esto ha permitido realizar análisis filogenéticos como el reportado por Esteves y col. (2008).

La cepa Uy-1999 no fue re-aislada luego de la inmunodepresión (año 2004). Esto podría ser ocasionado por la ausencia de alguna de las glicoproteínas (gp) mayores de BoHV-1.1 ya que Schynts y col. (2003), demostraron que las cepas mutantes, que no poseen el gen que codifica la gpE, no generan latencia luego de la infección. Kaashoek y col. (1996), comunicaron que algunas cepas de BoHV-1.1 presentan dificultades para ser reactivadas y re-aisladas luego de la inmunodepresión con corticoides, atribuyéndolo a diferencias genéticas entre las cepas utilizadas. En este sentido, la cepa Uy-1999 demostró su capacidad para producir la enfermedad y fue re-aislada de terneros infectados experimentalmente durante 14 a 35 días pi (Alonzo, 2010). Por otro lado, los estudios de caracterización con enzimas de restricción (*Hind III*) y anticuerpos monoclonales anti-gpE no mostraron diferencias con las cepas de referencia (Puentes y col., 2007). La secuencia de la región carboxi terminal del gen que codifica la gpC de Uy-1999 no mostró mutaciones cuando se comparó con la región homóloga de las cepas de referencia (Esteves y col., 2008). Los estudios realizados hasta el momento, no han detectado diferencias antigénicas o moleculares que puedan explicar porque la cepa Uy-1999 nunca fue re-aislada.

Basados en estos resultados, es altamente probable que la detección de anticuerpos en el año 2004, haya sido estimulada por la infección natural a campo con la cepa Uy-2004 en el periodo marzo-mayo 2004.

La capacidad del toro Limousin de estimular una respuesta inmune anti-BoHV quedó evidenciada luego de la infección con la cepa Uy-2004. Sin embargo, la razón por la cual no se detectaron anticuerpos durante los 5 años posteriores al aislamiento de la cepa Uy-1999 y luego de la primera inmunodepresión con corticoides es aún desconocida.

CONCLUSIÓN

La infección natural con dos subtipos de BoHV-1 (1.1 y 1.2a) fue comprobada en un mismo animal con 5 años de diferencia.

Agradecimientos

Referencias Bibliográficas

- Alonzo P, Benavides U, Isnardi F, Puentes R, Carol H, Clavijo A, Del Campo R, Bonnevaux J, Weiblen R, Fondevila N, Romera S, Sadir A, Maisonnave J. (2002). Caracterización de un Herpesvirus 1.1 (HV-1.1) aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)* 37:15-22.
- Alonzo P, Benavides U, Isnardi F, Puentes R, Maisonnave J. (2004). Lack of specific immune response after BHV1 infection. In: Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congr Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (Montreal-Canada). Ed. Medimond, Immunology 2004, Bologna, pp. 161-164.
- Alonzo P. (2010). Herpesvirus Bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección. Tesis de Maestría en Salud Animal, Programa de posgrados de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.
- Babiuk L, Van Drunen L, Tikoo S. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
- D'Arce RCF, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, Ams CW. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88: 315-334.
- Davison, AJ. (2002) Evolution of the herpesviruses. *Vet microbiol* 86:69-88.
- Deas DW, Johnston WS. (1973). The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Vet Rec* 92:636-639.
- Engels M, Ackerman M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 53:3-15.
- Engels M, Steck F, Wyler R. (1981). Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 67:169-174
- Esteves PA, Dellagostin OA, Pinto LS, Silva AD, Spilki FR, Ciacci-Zanella JR, Hübner SO, Puentes R, Maisonnave J, Franco AC, Rijsewijk FAM, Batista HBCR, Teixeira TF, Dezen D, Oliveira AP, David C, Arns CW, Roehe PM. (2008). Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Research* 131:16-22.
- Al Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria – UdelaR y la tutora Dra. Jacqueline Maisonnave, ya que el presente trabajo forma parte de la tesis de Maestría en Salud Animal del Dr. Pablo Alonzo, «Herpesvirus Bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección».
- Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)-Uruguay quien financió parte de este trabajo.
- Al Dr. José Bonnevaux, quien comunicó el caso clínico y donó el animal para posteriores investigaciones.
- Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med* 85:34-40.
- Guy JS, Potgieter LND. (1985). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res* 46:893-898.
- Henderson LM, Katz JB, Erickson GA, Mayfield JE. (1990). In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gen deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 51:1656-1662.
- House JA, Baker JA. (1971). Bovine herpesvirus IBR/IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet* 61:320-335.
- Huck RA, Millar PG, Evans DH. (1971). Phenopostitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Vet Rec* 88:292-297.
- Karhs R. (1987). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *JAVMA* 171:1055-1064.
- Kaashoek M, Straver PJ, Van Roig EMA, Quack J, Van Oirschot J. (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet Rec* 139:416-421.
- Katz JB, Henderson LM, Erickson GA. (1990). Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. *Vaccine* 8:286-288.
- Lemaire M, Pastoret P, Thiry E. (1994). Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann Med Vét* 138:167-180.
- Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ, Thiry E. (2000a). Effects of Bovine Herpesvirus Type 1 Infection in Calves with Maternal Antibodies on Immune Response and Virus Latency. *J Clin. Microbiol* 38:1885-1894.
- Lemaire M, Meyer G, Baranowsky E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P, Thiry E. (2000b). Production of bovine herpesvirus type 1 seronegative latent carriers by administration of a live attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol* 38:4233-4238.
- Manual de Standards para Test Diagnósticos y Vacunas (2004) Elaborado por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), Cuarta edición, capítulo 2.3.5:1381-1439.

Infección natural de un toro con dos subtipos diferentes de Herpesvirus bovino tipo 1

- Meurens F, Schynts F, Keil GM, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, Thiry E. (2004). Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J Virol* 78:3872-3879.
- Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 85:57-69.
- Miller JM, Whetstone C, Van Der Maaten MJ. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-461.
- Pastoret P, Thiry E. (1985). Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immun Infect Dis* 8:35-42.
- Perez S, Inman M, Doster A, Jones C. (2005). Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J Clin Microbiol* 43:393-401.
- Pidone CL, Galosi CM, Echeverría MG, Nosetto EO, Etcherrigaray ME. (1999). Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B* 46:453-456.
- Puentes R, Alonzo P, Benavides U, Silva AD, Esteves PA, Roehe PM, Maisonnave J. (2007). Primer aislamiento de herpesvirus bovino 1 subtipo 2 (HVB-1.2) en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 42-168:9-13.
- Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, Langeveld JP, Meloen R, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA, Van Oirschot JT. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol* 80:1477-1483.
- Schynts F, Meurens F, Detry B, Vanderplasschen A, Thiry E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J Virol* 77:12535-12542.
- Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 40 (157): 5-28.
- Thiry E, Saliky J, Bublot M, Pastoret P. (1987). Reactivation of infections bovine rhinotracheitis virus by transport. *Com ImmunMicrobiol Infect Dis* 10:59-63.
- Thiry E, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A, Schynts F. (2006). Recombinants in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113:171-177.
- Tikoo S, Campos M, Babiuk L. (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45:191-223.
- Van Oirschot JT. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 17:29-33.
- Wentink GH, Rutten VPMG, Van exel ACA, De Jong WAC, Vleugel H, Hensen EJ. (1990). Failure of an *in vitro* lymphoproliferative assay specific for bovine herpesvirus type 1 to detect immunized or latently infected animals. *Vet Q* 12:175-182.
- Whetstone CA, Miller JM. (1989). Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* 107:27-34.
- Whetstone CA, Miller JM, Bortner D, Van Der Maaten M. (1989a). Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* 7:527-532.
- Whetstone CA, Miller JM, Bortner D, Van Der Maaten M. (1989b). Changes in the bovine herpesvirus genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch Virol* 106:261-279.