

Tesis de Posgrado

Caracterización molecular y diagnóstico rápido de herpes virus bovino-1

Suárez Heinlein, Alejandra

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Suárez Heinlein, Alejandra. (1992). Caracterización molecular y diagnóstico rápido de herpes virus bovino-1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2466_SuarezHeinlein.pdf

Cita tipo Chicago:

Suárez Heinlein, Alejandra. "Caracterización molecular y diagnóstico rápido de herpes virus bovino-1". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2466_SuarezHeinlein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CARACTERIZACION MOLECULAR Y DIAGNOSTICO RAPIDO DE
HERPESVIRUS BOVINO-1**

ALEJANDRA SUAREZ HEINLEIN

Director de Tesis: Dr. MARCOS RODRIGUEZ

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE VIROLOGIA, CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENCIAS VETERINARIAS, INTA, CASTELAR

Tesis presentada para optar al titulo de Doctor en Ciencias Biologicas.

1992

*Tesis
2466
ej. 2*

A mi mamá,

A la memoria de abuela Celina y tío Ricardo ...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Marcos Rodriguez por haberme dirigido y orientado en la realizacion de este trabajo.

Al Dr. Alejandro A. Schudel por la oportunidad de realizarlo en el Instituto de Virologia-INTA-Castelar y por su valioso juicio critico.

A todo el personal de INTA por su colaboracion, en particular al Dr. Osvaldo Zabal, por la provision de todo lo necesario para el cultivo de celulas.

A Gabriel Pinto por su buena predisposicion.

A Fernando Mazeris por su buen humor.

A Marcos Parraud por su invaluable ayuda.

A Analia por su incondicionalidad permanente.

A Analia, Mariana, Eliana, Ana Maria, Gustavo, Pablo y Antonio por todos los momentos compartidos en el laboratorio.

A mis amigos Silvina, Marcelo y Judith por su buena onda, estimulo y por ser mis amigos.

A mi mama, por su apoyo constante y permanente ayuda.

A Alberto.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. Cuadros clinicos y características anatómo-patológicas producidas por BHV-1.....	1
I.2. Antecedentes históricos.....	3
I.3. Clasificación de los herpesvirus bovino-1.....	5
I.3.1. Aspectos bioquímicos, biofísicos y morfológicos.....	9
I.3.2. Ciclo replicativo.....	10
I.3.3. Efecto citopatogénico y rango de huéspedes susceptibles.....	11
I.3.4. Proteínas y antígenos.....	13
I.4. Patogenia.....	16
I.5. Epidemiología.....	21
I.6. Diagnóstico y caracterización.....	23
II. OBJETIVOS.....	27
III. MATERIALES Y METODOS.....	28
III.1. Cultivos celulares.....	28
III.2. Aislamiento viral.....	28
III.3. Anticuerpos monoclonales.....	29
III.4. Inmunoperoxidasa para la caracterización de aislamientos.....	30
III.5. Infección y marcado de células.....	30
III.6. Preparación de muestras para electroforesis en gel de poliacrilamida.....	31
III.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) , transferencia y exposición..	31
III.8. Inmunoprecipitación.....	32
III.9. Inmunoblotting.....	32
III.10. Desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido.....	33
III.11. Caracterización viral a partir de improntas de cerebro.....	34

	Pág.
IV. RESULTADOS.....	35
IV.1. Análisis de las cepas aisladas en Argentina.....	35
IV.2. Caracterización de aislamientos.....	40
IV.2.1. Análisis de reactividad de antígenos inducidos por cada una de las cepas.....	42
IV.2.2. Análisis de proteínas virales metabólicamente marcadas.....	44
IV.2.3. Distribución geográfica de los aislamientos analizados.....	46
IV.2.4. Relación entre tipos y entidades clínicas.....	48
IV.2.5. Análisis de aislamientos locales con patrón BHV-1.3.....	49
V.3. Inmunoperoxidasa como método diagnóstico rápido.....	54
IV.3.1. Detección de antígenos de BHV-1.....	54
IV.3.2. Caracterización viral.....	55
V. DISCUSION.....	57
VI. CONCLUSIONES.....	64
VII. RESUMEN.....	65
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	67

ABREVIATURAS

ACM(s)	anticuerpo(s) monoclonal(es)
BB1-5	buffer bloqueo 1-5 % leche descremada
BVH-1	herpesvirus bovino-1
BSA	seroalbumina bovina
cpm	cuentas por minuto
DICT 50/ml	dosis infecciosa cultivo de tejidos 50/ml
E	temprana
EDTA	acido etilendiamino tetraacetico
EHV	herpesvirus equino
g	glicoproteina
HSV	virus herpes simplex
IB	inmunoblotting
IBR	rinotraqueitis infecciosa bovina
IE	inmediatamente temprano
Ig	inmunoglobulina
IP	inmunoprecipitación
IPI	inmunoperoxidasa indirecta
LA	Los Angeles (cepa respiratoria prototipo BHV-1. 1)
L	tardio
LT	linfocitos T
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney (linea celular)
MEM	medio esencial minimo
PAP	peroxidasa antiperoxidasa
PM	peso molecular
PRV	virus de la pseudorabia
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis desnaturalizante en gel de poli(acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio)
vp	polipeptido viral

I. INTRODUCCION

El interés en el estudio de los herpesvirus bovinos tipo 1 (BHV-1), se origina en su considerable importancia económica, difusión y capacidad para establecer infecciones latentes.

Los virus herpes, miembros de la familia Herpesviridae, subfamilia alfa herpesvirinae, son frecuentes agentes de enfermedades de los bovinos, afectando la producción en términos de mortalidad, morbilidad y complicaciones con otras patologías infecciosas.

I.1. CUADROS CLINICOS Y CARACTERISTICAS ANATOMO-PATOLOGICAS PRODUCIDAS POR BHV-1

Las manifestaciones clásicas de una infección con BHV-1 son la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV). El virus invade los tractos respiratorio y genital, causando, rinotraqueitis y vulvovaginitis y balanopostitis en hembras y machos respectivamente. A diferencia de la IPV, la IBR puede ser una enfermedad severa, particularmente cuando el cuadro presenta complicaciones bacterianas (Yates, 1982). Mientras las infecciones genitales son de naturaleza local y se caracterizan por no dejar secuelas, la infección del tracto respiratorio puede asociarse a conjuntivitis y secundariamente a abortos, casos raros de enteritis y, ocasionalmente, meningoencefalitis en terneros (Wellemans y Leunen, 1974; Pastoret, 1978).

Experimentalmente se demostró que, el virus puede producir lesiones erosivas en la cavidad bucal y, aunque rara vez, en el tracto digestivo de neonatos (Baker y col., 1960). También ha sido sugerido su rol etiológico en la queratoconjuntivitis (Hughes y col., 1964).

En la forma respiratoria, usualmente las lesiones clínicas están restringidas al tracto respiratorio superior, con exudado nasal y traqueitis, pero pueden también extenderse al tracto respiratorio inferior con bronquitis y neumonía. La infección experimental del bovino por vía intranasal con virus aislado de casos de IBR produce un cuadro que mimetiza a la enfermedad natural, de desarrollo agudo aunque, en general, menos severa (Pastoret y col., 1978). El período de incubación en la infección experimental, generalmente es de 2-3 días. Se cree que en la infección natural este período es más largo, probablemente de una semana. Los signos clínicos locales están precedidos y acompañados por una hipertermia intensa (Schroyer y Easterday, 1968). En la

enfermedad leve sin complicaciones producida por BHV-1 los signos consisten esencialmente en rinitis con exudación serosa en la cavidad nasal. Las células del tracto respiratorio superior (faringe y tráquea), se infectan inmediatamente luego de la exposición, resultando en una inflamación catarral aguda. Dentro de 24-48 horas los animales presentan fiebre y depresión. El apetito usualmente disminuye y consecuentemente hay pérdida de peso. Frecuentemente la conjuntivitis acompaña los signos respiratorios. Sin complicaciones, el curso de la infección es de 7-10 días seguido de una rápida recuperación. En los casos más severos, puede presentarse bronconeumonía como consecuencia de infección bacteriana secundaria por la inhalación de exudados traqueales. La muerte puede sobrevenir en forma aguda o luego de una enfermedad crónica. Los animales que sobreviven a la neumonía nunca se recuperan totalmente.

El curso de la infección en terneros depende de la edad de éstos y de si han recibido ó no anticuerpos colostrales. La infección de terneros de 4-6 meses de edad lleva ocasionalmente a un cuadro de meningoencefalitis, mientras que en los adultos, si la exposición ocurre entre los 5 y 7 meses de gestación, se producen abortos. Antes o durante el cuadro encefalítico se presentan signos respiratorios de manera leve. Los signos neurológicos incluyen incoordinación, ataxia, y periodos alternados de depresión e hiperexcitación, pudiendo en algunos animales presentarse ceguera. El curso de la enfermedad neurológica es de 4-5 días y casi sin excepción termina con la muerte. Existen estudios que indican que cepas de virus asociadas a esta infección son primariamente neurotrópicas en la naturaleza (Mc Kercher y col., 1973). En los animales muertos por encefalitis, sólo se observa una leve congestión en las meninges aunque las lesiones histológicas están presentes en todo el cerebro, siendo más severas en cerebelo, tálamo, y ganglios basales. Las razones por las cuales los animales jóvenes parecen ser más susceptibles a este tipo de cepas no han sido esclarecidas (Rossi y Kiesel, 1977; Babiuk y Rose, 1979). Si el ternero recién nacido no está protegido por anticuerpos colostrales usualmente la infección con BHV-1 es sistémica y fatal según ha sido demostrado experimentalmente (Baker y col., 1960; Kendrick y Straub).

Con respecto al feto, es muy susceptible a la infección con BHV-1. Luego de la infección in utero por vía parental ó intranasal sigue una enfermedad aguda generalizada, que finaliza con el aborto (Owen y col., 1968; Molello y col., 1966; Kennedy y Richards, 1964; Stubbings y Cameron, 1981; Ludwig y Storz, 1973; Kendrick, 1973). La prevalencia de los abortos en un rodeo depende de varios factores, siendo el más importante el estado inmune de la madre (Owen y col., 1968). Los cambios patológicos observados en fetos abortados no tienen significación diagnóstica.

En la forma genital de la infección el periodo de incubación es de 24-72 horas, seguido por una respuesta febril de varios días de duración. El apetito no se ve afectado y no hay disminución significativa en la producción láctea. En las hembras afectadas con signos leves, la inflamación de la mucosa vulvar presenta pequeñas pústulas blanquecinas distribuidas sobre su superficie en forma lineal. La mucosa vaginal se encuentra apenas congestiva pero las pústulas están ausentes, aunque generalmente se presenta exudado amarillento. En bovinos severamente afectados las pústulas vulvares se unen para formar placas de color amarillento, mientras aparecen focos hemorrágicos en la mucosa inflamada acompañada por gran cantidad de exudados vaginales. La recuperación clínica ocurre en 10-14 días, aunque el exudado vaginal puede persistir por varias semanas.

En los machos hay hiperemia de la mucosa genital, precedida por un cuadro febril transitorio. En casos más severos la infección se caracteriza por hipertermia y pústulas que, de manera similar a lo que ocurre en las hembras, aparecen principalmente en la mucosa de los pliegues prepuciales y en el glande, mientras unas pocas están diseminados sobre el pene. Luego de algunos días las pústulas se escarifican, dejando úlceras crateriformes.

I.2. ANTECEDENTES HISTORICOS

BHV-1 se caracteriza por manifestarse a través de múltiples cuadros clínicos, afectando tanto al aparato respiratorio, reproductivo, digestivo como también al sistema nervioso central.

Originalmente la enfermedad en bovinos fue reconocida en Europa al comienzo de siglo y llamada exantema vesicular coital (Bläschenausslag). La descripción clínico-patológica es amplia en textos

de la época (Hutyra y Mareck, 1910). Promediando el siglo se determinó en Estados Unidos de Norteamérica la etiología viral del cuadro conocido como IBR y se estableció su relación con el virus de la IPV (Gillespie y col., 1959)

La IBR es una enfermedad respiratoria del bovino, por primera vez descrita en Estados Unidos en 1954 (Schroeder y Moys, 1954; McKercher y col., 1954; Jensen y col., 1955; Miller, 1955)

La IPV es una enfermedad venérea del bovino descrita por primera vez en Alemania en la mitad del siglo pasado por Bucher (citado por Kokles, 1967); en 1894. Trommsdorf le dió su nombre definitivo: Blaschenausschlag. La misma enfermedad venérea fue descrita por Steddom en Estados Unidos por primera vez en 1895. Estos datos indican que la IPV bovina existía antes que la IBR tanto en Europa como en Estados Unidos. La mayoría concuerda en el hecho de que el virus de la rinotraqueítis emergió a partir del virus de la IPV en los Estados Unidos, más tarde en Europa, como resultado de ciertos cambios mayores en la cría del ganado como el hacinamiento de numerosos animales dentro de un mismo rodeo (Gilbert y Saurat, 1970; Pastoret, 1979)

El primer aislamiento viral fue reportado en 1956 a partir de casos de rinotraqueítis infecciosa en bovinos en los Estados Unidos (Madin y col., 1956; York y col., 1957). Este aislamiento mostró ser serológicamente idéntico a otros aislamientos originarios de casos de IPV (Gillespie y col., 1959; Wagner y Gillespie, 1959; McKercher y col., 1954). Ambas entidades clínicas parecían entonces ser causadas por el mismo agente, hasta ese momento conocido como Bovid herpesvirus 1 (BHV-1) (Roizman y col., 1973; Roizman y Furlong, 1974). Se diseñaron entonces experimentos para comparar la patogenicidad de ambos tipos de aislamientos tanto del tracto respiratorio (IBR) como del genital (IPV), y se mostró que ambos tipos dan los mismos resultados en el tracto genital, mientras cepas de IPV descargadas por vía intranasal sólo producen una enfermedad respiratoria leve y el animal infectado excreta cien veces menos virus.

En realidad, la IBR y la IPV muy raramente ocurren de manera simultánea en el mismo rodeo (Kahrs y Smith, 1965; Kahrs, 1977). Entonces IBR e IPV, aunque serológicamente idénticos y muy difíciles de diferenciar por serología convencional y medios virológicos, difieren en alguna propiedad biológica. La mayoría concuerda en el hecho de que el virus de la rinotraqueítis emergió

a partir del virus de la IPV en los Estados Unidos, más tarde en Europa, como resultado de ciertos cambios mayores en la cría del ganado como el hacinamiento de numerosos animales dentro de un mismo rodeo (Gilbert y Saurat, 1970; Pastoret, 1978). En Africa, Bovid herpesvirus 1 ha sido solo aislado a partir de casos de vulvovaginitis pustular en animales salvajes aunque muchos otros bovidos pueden hospedar el virus (Straub, 1978)

1.3. CLASIFICACION DE LOS HERPESVIRUS BOVINO 1 (BHV-1)

La denominación Herpesvirus deriva del griego herpes que significa lesión. Los miembros de la familia Herpesviridae, se encuentran altamente diseminados en la naturaleza, habiéndose aislado más de 80 herpesvirus de una gran variedad de hospedadores animales, mamíferos, reptiles y aves en los últimos 50 años. Muy pocas familias de virus pueden demostrar tan amplia distribución como la de Herpesviridae (Roizman, 1982)

Los viriones de los varios herpesvirus no pueden ser diferenciados entre sí en base a la morfología y características generales de su ciclo replicativo, pero sí en base a sus propiedades biológicas, bioquímicas, inmunológicas y estructura genómica.

En base a rango de sus hospedadores naturales, duración del ciclo replicativo y características citopatogénicas in vitro e in vivo, ha sido posible identificar 3 subfamilias dentro de la familia Herpesviridae (Matthews, 1982):

- alfa, con capacidad de causar infecciones severas y enfermedad recurrente (ej. herpes simplex)
- beta, de transmisión intraplacentaria con malformaciones congénitas (ej. citomegalovirus)
- gama, en general asociado a enfermedades linfoproliferativas letales (ej. Epstein Barr)

En la actualidad se reconoce que la familia Bovidae es hospedador natural de seis diferentes grupos de BHV que producen cuadros patológicos definidos o infección subclínica. También se ha observado su asociación a ciertos cuadros clínicos pero sin comprobación etiológica (Ludwig, 1983) (figura 1)

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), (Straub, 1978; Dannacher y col., 1980) y la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), son causados por el BHV-1. BHV-1 es también responsable de otras entidades clínicas que incluyen conjuntivitis, abortos, encefalitis e infecciones sistémicas generalizadas (Wellemans, 1975; Kahrs, 1977; Gibbs y Rweyemamu, 1977; Dhenin y col., 1979)

FIGURA 1: CLASIFICACION DE VIRUS HERPES BOVINO*

Grupo viral	Entidad Clínica	Cepa prototipo	Hospedador
BHV-1 (Bovid herpesvirus 1)	Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV).	LA(a)	Bovino
BHV-2 (Bovid herpesvirus 2)	Mamilitis a virus herpes	TVA(b)	Bovino
BHV-3 (Bovid herpesvirus 3)	Fiebre catarral maligna	WC11(c)	Biungulados salvajes
BHV-4 (Bovid herpesvirus 4)	Varias formas clinicas-tumores-piel	Movar 33/63(d)	Bovino
BHV-5 (Bovid herpesvirus 5)	Varias formas clinicas-en ovinos.	JS/3(e)	Ovino
BHV-6 (Bovid herpesvirus 6)	Varias formas clinicas en caprinos	E/CH(f)	Caprino

*: Ludwig, 1983. The herpesviruses. Vol 2. Ed : B. Roizman

a: Madin et al., 1956. b: Rweyemamu et al., 1969. c: Plowright et al., 1975. d: Bartha et al., 1966. e: De Villiers, 1979. f: Mettler et al., 1965

Los tipos de BHV-1 pueden ser caracterizados precisamente a través del análisis de ADN viral utilizando enzimas de restricción. Fue así como en un primer momento se definen dos tipos (Nettleton y col., 1984): tipo 1 o tipo Cooper (IBR like) y tipo 2 o tipo K22 (IPV like) (Ludwig, 1984). Esto fue confirmado mediante perfiles proteicos de polipéptidos inducidos por las diferentes cepas de BHV-1. Las (proteínas virales) vp9 y vp22 son dos proteínas con patrón de migración tipo específica y otras 2 (vp23 y vp25) con especificidad de subtipo, definen los subtipos 2a y 2b.

Hasta ese momento un aislamiento podía ser asignado a su correspondiente tipo por: análisis de ADN viral, evaluación de su perfil proteico o reactividad con ACMs (Metzler, 1985)

Posteriormente, las características proteicas y genómicas de varios aislamientos de BHV-1 realizados en Argentina de bovinos con enfermedad neurológica permitieron definir el tipo 3 que representaba una variante no reconocida previamente no pudiendo ser agrupado en ninguno de los tipos establecidos.

Un aislamiento de Australia (N569) que comparte la mayoría de las características con los BHV-1 aislados en Argentina también se originó de un caso neurológico y posee potencial neurotrópico.

El análisis con ACMs de los virus tipo 3 muestra que, este presenta un sustancial número de determinantes antigénicos comunes a la mayoría del tipo 1 y 2 (anticuerpos monoclonales inducidos con BHV-1.1 reaccionan parcialmente con aislamientos iguales a BHV-1.3, lo que define diferencias antigénicas entre los tipos). El patrón de restricción de su ADN genómico los distingue así como también la conducta migratoria de algunas proteínas (vp9, vp12, vp17A, vpl y vp30). Dos subtipos 3a y 3b pueden definirse a partir del patrón de migración de los polipéptidos vp22 y vp25 (Metzler, 1986)

I. 3. 1. ASPECTOS BIOQUIMICOS, BIOFISICOS Y MORFOLOGICOS

BHV-1 posee las características morfológicas y propiedades fisicoquímicas de otros miembros de la familia.

Las partículas de los herpesvirus tienen un diámetro que oscila entre los 120 nm y los 300 nm.

Los componentes del virión son:

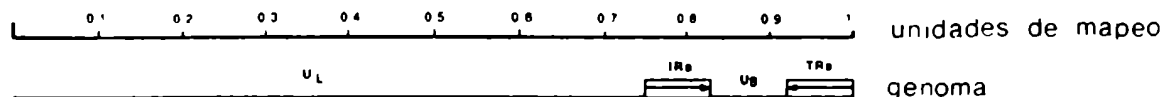
1. - un núcleo o core constituido por un ovillo fibrilar que envuelve a una doble cadena lineal de ADN.
2. - una capsida de estructura icosaédrica de 95 a 105 nm de diámetro, con 12 capsómeros de 5 lados y 150 capsómeros hexaméricos.
3. - un tegumento, zona granular envolvente compuesta de proteínas globulares y
4. - una envoltura provista de proyecciones cortas periódicas, de naturaleza membranosa, que rodea al resto de los componentes virales (Roizman y Furlong, 1974).

Su genoma consiste en una doble cadena de ADN de peso molecular 88×10^6 covalentemente unido a ribonucleótidos (Babiuk y Rouse, 1976).

La densidad de la molécula de ADN es de aproximadamente 1,730 g/ml el cual corresponde a un alto porcentaje de G+C. La molécula de ADN representa más del 6 % de la partícula viral y está insertada en el core ó núcleo. Codifica para proteínas estructurales y no estructurales (Pastoret, 1982). Su longitud es de 140 kb compuesto por dos secuencias nucleotídicas únicas denominadas UL y US de 105 y 11 kb respectivamente. US está flanqueado por secuencia repetidas internas y terminales de 12 kb cada una que permiten invertirse al componente US, resultando en dos formas isoméricas del genoma de BHV-1 (figura 2). En base a la estructura genómica de BHV-1 ha sido clasificado junto con herpesvirus equino (EHV-1), el virus de la pseudorrabia (PRV) y el de la varicela zoster como grupo D ó clase 2, herpes simplex 1 (HSV-1), que posee 2 pares de repeticiones, en cambio, pertenece al grupo E ó clase 3. Asimismo fue posible identificar 54 transcritos durante la infección productiva de BHV-1 con tamaños que oscilaron entre 0,4 y 8 kb. Mediante la utilización de inhibidores metabólicos y Northern blot pudo determinarse su distribución temporal y espacial. De este modo se identificaron 3 transcritos mayores y uno menor

inmediatamente tempranos (IE) agrupados alrededor de la secuencia repetitiva interna y terminal (IRS TRS). Doce fueron clasificados dentro de la categoría tardíos (L) codificados por la secuencia UL del genoma. Veintiun transcritos correspondieron a la clasificación temprana (E) con localización dispersa sobre el genoma entero. Diecisiete resultaron sin asignación (Wirth, 1989)

FIGURA 2 Mapa del genoma de BHV-1



I.3.2. CICLO REPLICATIVO

Para iniciar la infección, la envoltura vírica debe fijarse a receptores específicos de la membrana celular. Tras la adsorción, esa envoltura se funde con la membrana plasmática, lo que permite que la nucleocápside penetre directamente en el citoplasma. Viriones intactos pueden también entrar en vacuolas fagocíticas, de las cuales son liberados por una fusión similar de la envoltura vírica y la membrana. La cápside desnuda es transportada hacia el núcleo donde es liberado el ADN a través de los poros de la membrana nuclear.

El periodo de eclipse es de 5 a 6 hs en los cultivos en monocapa y el pico de producción vírica ocurre aproximadamente a las 17 hs post-infección. Cada célula elabora de 10^4 a 10^5 partículas físicas, de las que sólo 100 son infecciosas.

La transcripción y replicación del ADN viral y ensamble de las cápsides tienen lugar en el núcleo. Al igual que otros virus que contienen ADN, los fenómenos bioquímicos, son regulados secuencialmente pero en el caso de los herpesvirus la replicación tiene características únicas. El principal control de la expresión genética parece realizarse por la elaboración postranscripcional. La síntesis y traducción de los ARN mensajeros son regulados coordinadamente. La síntesis de las proteínas tempranas inmediatas (IE ó alfa) es necesaria para la síntesis de proteínas tempranas (E ó beta), y estas proteínas estructurales y no estructurales son necesarias para la síntesis de las proteínas tardías estructurales mayores (gamma). En la replicación del ADN vírico intervienen las

proteínas alfa y beta y enzimas de la célula huésped.

El ensamble ocurre en etapas: en principio solamente la cápside rodea al nucleóide denso de ADN, en este momento la partícula no es infecciosa y es inestable. La envoltura, que se adquiere de la membrana nuclear, contiene subunidades específicas del virus (en particular glicoproteínas), así como proteínas y lípidos de la célula hospedadora. El virus madura y adquiere infectividad al ser liberado al espacio extracelular. El proceso toma aproximadamente 18 hs.

I. 3. 3. EFECTO CITOPATOGENICO Y RANGO DE HUESPEDES NATURALES

Los herpesvirus replican fácilmente en cultivos celulares de un amplio rango de órganos bovinos incluyendo riñón, piel embrionaria, glándulas adrenales, timo, tiroides, páncreas, testículo, pulmón y nódulos linfáticos. También replica en cultivos de riñón de cordero, testículo y bazo así como en amnios humano y células HeLa, pero en la última sólo luego de una adaptación. En todos los tipos de cultivo celulares utilizados, el efecto citopático producido es morfológicamente muy similar.

En monocapas el efecto se visualiza en forma de placas con diámetros que van desde 1-2 mm en el 3 dpi a 5 mm hacia el día 9 (Hahnefeld y Hahnefeld, 1962). En el cultivo en laminillas teñido con Giemsa o hematoxilina y eosina, se observan unas pocas células gigantes multinucleadas, en la periferia del foco, indicando el límite de formación sincicial, en contraste con los otros herpesvirus (Armstrong, 1961). También se observan cuerpos de inclusión presentes tanto *in vivo* como *in vitro*.

Existe un consenso en que el ganado bovino es el único huésped natural del virus. Sin embargo, se han reportado epidemias en Suecia de balanitis y vaginitis en cerdos causada por un virus indistinguible de BHV-1 (Onstad, 1967). También se aisló BHV-1 de cabras con severa enfermedad respiratoria acompañada con queratitis (Mohanty y col., 1972). En ciervos, se detectaron anticuerpos contra el virus, observándose, luego de la inoculación traqueal, un cuadro clínico similar aunque más leve del que ocurre en el bovino (Chow, 1964). También se detectaron anticuerpos neutralizantes contra BHV-1 en altos porcentajes en búfalos africanos y ganado doméstico (76 y 85 % respectivamente), y en ñus en Tanzania (Rweyemamu, 1973).

El ganado bovino puede ser infectado fácilmente, por vía intranasal o intravaginal, de manera experimental, aunque otras especies como mono, oveja, cerdos, caballos, cobayos, ratón, perro, gato y embrión de pollo, son refractarios a la infección. Estos hallazgos han sido confirmados por numerosos investigadores (Gilber y Saurat, 1970).

La infección experimental ha sido descrita en cabras, suino, búfalos, ñus, visones y hurones.

Los estudios de patogénesis y evaluación vacunal están limitadas al bovino. Smith estudió la patogénesis de IBR en hurones de Inglaterra y propuso esta especie como modelo experimental (Smith, 1978).

El conejo es susceptible a la infección con IBR. Bindrich observó vulvovaginitis y conjuntivitis en conejos infectados con IBR (Bindrich, 1960). Bwangamoi y Kaminjolo aislaron IBR de lesiones dérmicas y testiculares en conejos (Bwangamoi y Kaminjolo, 1973). Kelly proveyó de evidencias por microscopía electrónica de replicación de herpesvirus en el hígado y glándulas adrenales de conejos experimentalmente infectados (Kelly, 1977).

El mismo autor sugirió que los conejos neonatos pueden ser útiles como hospedadores experimentales para estudios en la patogénesis de la infección con IBR. La infección por vía intraperitoneal en conejos adultos con cepas respiratorias de BHV-1 resulta en replicación del virus en el hígado y suprarenal detectables por infecciosidad e inmunofluorescencia 5 días post-infección (Kelly, 1977). Esto ocurre en ausencia de sintomatología y no produce secuelas. Se puede establecer infección con BHV-1 en conejos cuando se los inocula vía intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal o administrado por ruta conjuntival. Las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad son similares a aquellas reportadas para bovino, incluyendo, infección sistémica neonatal, conjuntivitis, vulvovaginitis, dermatitis, aborto e infección del tracto respiratorio. El tratamiento con dexametasona durante 7 días previos a la infección y continuado luego de ésta, determina en el conejo neocelandés una enfermedad sistémica con importante necrosis hepática y suprarenal que llevan al animal a la muerte (Kahrs, 1977; Lupton, 1980).

I. 3. 4. PROTEINAS Y ANTIGENOS

Como otros herpesvirus, BHV-1 exhibe regulación de síntesis proteica en cascada temporal (Roizman, 1985). Este hecho fue reportado por primera vez por Misra y col., que identificaron proteínas electroforéticamente distintas y clasificaron cuatro como inmediatamente tempranas (IE) y seis como tardías (L) (Misra y col., 1981). El número total estimado de proteínas virales ha aumentado a través de los años. Pastoret y col. identificaron 21 proteínas por análisis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), Misra y col. encontraron 25 con la misma técnica, y con isoelectroenfoque observaron al menos dos glicoproteínas (gI y gII) y 5 proteínas no glicosiladas (69K-35K) adicionales (Pastoret y col., 1980; Misra y col., 1981). Bolton y col. observaron el mismo número y demostraron que 15 de estas proteínas copurificaban con nucleocápsides, 13 estaban asociadas a envoltura, y no pudieron asignar las restantes a ninguna estructura viral (Bolton y col., 1983). Metzler y col., ajustando la metodología de separación electroforética y con experimentos de inmunoblotting, ennumeraron 38 (Metzler y col., 1986; 1985). Esto sumado al número de proteínas virales no estructurales (15 estimadas por Misra, al menos 5 por Metzler), hace presumir un total de 43-48 proteínas específicas. En realidad este número podría ser mayor aun, considerando que el tamaño del genoma de BHV-1 es intermedio entre el de varicela zoster y HSV-1, que contienen 67 y 70 genes respectivamente. Del total de proteínas identificadas, hasta el presente, algunas están glicosiladas, muchas de ellas con funciones no definidas (Pastoret, 1980)

Los polipéptidos virales de BHV-1 pueden ser agrupados en, al menos, tres clases, alfa (IE), beta (E, dependientes de síntesis proteica viral anterior), y gama (L, dependientes de la replicación del ADN viral) (Misra, 1981).

Las proteínas alfa intervienen en la regulación del ciclo productivo del virus, y se ha señalado que quizá también jueguen un rol en la infección latente (Everett, 1987; Roizman, 1987)

La función de varias proteínas beta parece estar relacionada con la síntesis de ADN viral. Los polipéptidos beta están también involucrados en la inhibición de la síntesis de proteínas alfa y del

huésped y en la inducción de genes alfa. Finalmente, la mayoría de las proteínas gama identificadas hasta hoy parecen ser estructurales y representan aproximadamente la mitad de los productos genicos conocidos de herpesvirus (Roizman, 1985)

El genoma de BHV-1 codifica para cuatro únicas glicoproteínas o complejos glicoproteicos, designados gI, gII, gIII, gIV. gI, gIII y gIV han sido las más estudiadas dado que constituyen el mayor componente inmunogenico del virión. Las gI y IV han sido clasificadas como proteínas beta y gIII como gama (Ludwig, 1987). Las gI, gII, gIII y gIV, así designadas por van Drunen Littel-van den Hurk y Babiuk, equivalen respectivamente, a las denominadas g7/17/23, g10, gp3/12 y g17A por Friedly y Metzler (van Drunen Littel-van den Hurk y col., 1986; Friedly y col., 1987). Por otra parte, al comparar las proteínas de BHV-1 y HSV-1, las gI, gIII y gIV tienen su equivalente en gB, gC y gD respectivamente.

Las glicoproteínas constituyen el principal componente viral presente en la envoltura de los herpesvirus: están involucradas en el reconocimiento, adsorción y penetración del virus en la célula huésped así como en la neutralización viral (Little y col., 1981; Fuller y Spear, 1987; Sarmiento y col., 1979; Vestergaard, 1979; Glorioso, 1984)

En el 12avo Encuentro Internacional de Herpesvirus en Filadelfia en 1987, se expuso la localización de los genes correspondientes a estas glicoproteínas en el genoma de BHV-1, así como la secuencia de aminoácidos que codifican y el grado de homología con las supuestamente glicoproteínas equivalentes al PRV y HSV-1. Esta homología pareció convincente para gI (54 y 44 % de homología respectivamente), pero parcial para gIII y gIV con la g92 y g50 de PRV y la gC y gD respectivamente de HSV-1 (en el orden del 20 %) (Zamb, 1987; Misra y col., 1988)

El mapa de transcripción para BHV-1 no está aún completo en cuanto a la información sobre el número, tamaño y ubicación en el genoma de los transcritos IE ó alfa, que codifican para entre 4 y 7 proteínas IE electroforéticamente diferentes. Se tiene, en cambio, amplia información sobre productos genicos E ó beta y L ó gama, en particular las glicoproteínas responsables de la respuesta inmune durante una infección in vivo, que son de interés en lo que respecta al desarrollo de vacunas (van Drunen Littel-van den Hurk, 1989)

Recientemente, las proteínas IE ó alfa de HSV-1 mostraron ser reconocidas por linfocitos T (LT) y pueden estimular inmunidad protectora como ya se observó en citomegalovirus (Martin, 1988; Reddehase, 1987)

Las proteínas gI, gIII y gIV estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes en ratones, conejos y ganado bovino y son blanco de la lisis por complemento dependiente de anticuerpo y de células infectadas (Collins y col., 1984; van Drunen Littel-van den Hurk y col., 1984; van Drunen Littel-van den Hurk y Babiuk, 1985; Marshall y col., 1986; Okasaki y col. 1986; Trepanier y col., 1986; Israel y col., 1988). Se ha demostrado que tanto la capacidad de mediar la neutralización viral, como la lisis de células infectadas, está localizada en un número diferente de epitopes en cada una estas tres glicoproteínas (Collins y col. 1984; van Drunen Littel-van den Hurk y col., 1985; Okasaki y col. 1986; Marshall y col. 1988; Hughes y col. 1988). Las mismas proteínas gI, gIII y gIV han sido identificadas como las glicoproteínas con mayor poder inmunogénico cuando el ganado es infectado con BHV-1 (Collins y col. 1985; van Drunen Littel-van den Hurk y Babiuk, 1986). Mas aun cada una de las gI, III y IV, individualmente o combinadas, pueden inducir, en bovinos, inmunidad protectora contra el desafío con BHV-1 (Babiuk y col., 1987). Las gI y IV son blancos primarios de anticuerpos neutralizantes y protectores (Babiuk y col. 1987). Se ha sugerido que la pérdida de carbohidrato produce una reducción en la respuesta de anticuerpos neutralizantes al virus. En el caso de gI, esto se debería al cambio en tres epitopes definidos carbohidrato dependientes. De manera similar, la lisis de células infectadas con BHV-1 parece ser, al menos parcialmente, mediada por epitopes carbohidrato dependiente. En contraste, la respuesta inmune celular, cuando se inmunizó con proteína deglicosilada resultó exacerbada con respecto a la obtenida después de la inoculación con la glicoproteína nativa. (Van Drunen Littel-van den Hurk, 1990).

BHV-1 comparte componentes antigénicos con herpes virus equino (EHV-1), como se detectó por fijación de complemento ó test de inmunodifusión. (Carmichael, 1961).

I.4. PATOGENIA

Los BHV-1 invaden generalmente el organismo por vía respiratoria ó a través del tracto genital. En la enfermedad respiratoria en bovinos, el virus multiplica inicialmente en tejidos del tracto respiratorio-la infección local inicial involucra las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio- y se extiende, aparentemente, vía ductos lacrimales a tejidos oculares donde se establece el sitio de infección secundario. Experimentos in vitro han demostrado que BHV-1 puede replicar en células epiteliales pero también en células de la submucosa y del tejido conectivo (Yates, 1982). BHV-1 puede infectar macrófagos alveolares y monocitos de sangre periférica y alterar sus funciones (Forman y Babiuk, 1982; Bielefeldt Ohmann y col., 1984; Forman y col., 1982; Nyaga y Mc Kercher, 1980). Sin embargo, estudios in vivo de las interacciones entre LT bovinos y BHV-1 indicaron que los linfocitos de sangre periférica unen pocas partículas virales marcadas radioactivamente y que no hay replicación viral en los cultivos de linfocitos (Splitter y Eskra, 1986; Nyaga y Mc Kercher, 1980). Estos estudios sugieren que la interacción directa entre BHV-1 y leucocitos bovinos está limitada a monocitos/macrófagos. Luego de la infección con BHV-1 existe una marcada infiltración linfocitaria en la submucosa del tracto respiratorio y activación de LT de sangre periférica con incremento en la producción de IL-2 (Allan y col., 1980; Griebel y col., 1988). Estas observaciones junto con los datos obtenidos a partir de investigaciones realizadas con HSV-1, sugieren que una interacción entre BHV-1 y LT bovinos activados puede explicar parcialmente la alteración inducida por BHV-1 de la respuesta inmune. Los LT infiltrados en tejidos juegan un rol importante en la eliminación de infecciones locales por herpesvirus (Nash y col., 1987; Schmid, 1988). Si los LT locales fueran destruidos por BHV-1 el control de la infección podría verse demorado. También la destrucción de LT activados podría tener un efecto más amplio en la respuesta inmune del hospedador si la población local de LT incluyeran células con un rango de especificidad de antígeno. Este puede ser otro mecanismo por el cual una infección por BHV-1 resulta en una supresión no específica de las defensas pulmonares. Los LT bovinos activados son susceptibles a la infección por BHV-1 y la lisis en la ausencia de replicación viral o la expresión de niveles detectables de proteínas virales (Griebel, 1990)

In vivo, también, el epitelio del tracto respiratorio superior se destruye por el efecto citopático inducido por la infección viral. BHV-1 tiene un efecto dramático sobre las células epiteliales ciliadas de la mucosa traqueal, produciendo una pérdida significativa de las microvellosidades a los 4 días post-infección. Esta pérdida severa de microvellosidades acelera la invasión por otros microorganismos. La infección con BHV-1 produce un decrecimiento significativo en el porcentaje de fosfatidilcolina del contenido alveolar en bovinos inoculados experimentalmente. La alteración en el contenido de fosfolípidos en el material alveolar obtenido de animales inoculados con BHV-1 podría representar un compromiso importante en la defensa pulmonar del huésped. Además, la disrupción del contenido fosfolípido podría afectar tanto la capacidad de regular la propiedad tenso superficial alveolar y/o cambiar la permeabilidad de los capilares alveolares. El material alveolar fosfolípido tiene la propiedad de oponerse a la tensión superficial desarrollada por la superficie acuosa, previniendo que los alvéolos se colapsen y asegurando el volumen residual funcional a bajas presiones. Una alteración en la síntesis de fosfolípidos resulta en septicemia y deterioro de la barrera endotelial alveolar epitelial, el plasma ingresa a los espacios terminales de aire e inactiva el fosfolípido surfactante existente (Engen y col., 1991). Adicionalmente, la infección por BHV-1 lleva a una inmunodepresión y consecuentemente una susceptibilidad incrementada a infecciones bacterianas secundarias resultando en neumonías severas (Forman, 1982; Bielefeldt, 1985). El efecto supresivo inducido por BHV-1 sobre varios mecanismos inmunes fue examinado en detalle por Bielefeldt y Babiuk (Bielefeldt y Babiuk, 1985).

Algunas características de la infección con BHV-1 en ganado sugieren que, la forma genital proviene de la entrada del virus en la mucosa del tracto genital más que de una fase virémica. No es necesario que exista lesión en mucosa para que se establezca la infección (Pastoret, 1982)

El feto bovino es altamente susceptible a BHV-1 y sufre una infección aguda generalizada. En el tracto genital, BHV-1 infecta las células epiteliales de la mucosa vulvar y vaginal en las hembras y de los canales seminales, prepucio y testículo en los machos, provocando degeneración con policariocitosis de espermocitos.

La generalización, precedida por la infección local, se puede generar a través de tres caminos diferentes: viremia, vía neural ó por puentes intercelulares (Pastoret, 1982)

Luego de la infección primaria, la viremia resultante de una rinitis o conjuntivitis explicaría la patogénesis del aborto y de la mayoría de los casos raros de enteritis. Luego de la multiplicación viral en el sitio de infección primario, el virus es transportado por monocitos y aunque aún es controvertido, probablemente por otros leucocitos vía sanguínea hacia los órganos blancos tales como el sistema nervioso central, tracto digestivo, glándula mamaria y por vía transplacentaria al feto. (Nyaga, 1980; Yates, 1982)

La viremia que se observa es de bajo título y transitoria, fenómeno que puede ser debido a que es pequeño el número de leucocitos infectados presentes en circulación (Peter, 1966). Rossi y Kiesel detectaron replicación de BHV-1 en monocitos y leucocitos pero en el último tipo sólo luego de estimulación con fitohemaglutinina (Rossi y Kiesel, 1977)

Hay pocos datos que indiquen viremia en bovinos experimentalmente infectados, por ello es difícil comprender cómo el virus alcanza el feto que luego de una infección del animal preñado, sufre una infección aguda generalizada a partir de la viremia. Van der Maaten y Miller han demostrado que, luego de la inoculación intravenosa e intramuscular el virus alcanza el ovario vía hematogena (Van der Maaten, 1985; Miller, 1987).

Aunque no hay literatura específica concerniente, es probable que también ocurra a través de nervios periféricos, las inferencias se realizan a partir de las observaciones de HSV-1 (Hill, 1987). El virus, que multiplica intensivamente en las mucosas alcanza, a través de los nervios periféricos, el sistema nervioso central, donde algunas cepas pueden causar meningoencefalitis. En el caso de infecciones de BHV-1 que ocurren primariamente en la mucosa nasal, el virus podría ser transmitido por las fibras nerviosas que se extienden desde la mucosa olfatoria al bulbo olfatorio. De manera similar a la descrita para la encefalitis por HSV-1 en ratones, antígenos de BHV-1, detectables por inmunofluorescencia, se desplazan desde el sitio de la infección primaria al ganglio trigémino a través de prolongaciones de neuronas sensitivas para luego volverse indetectables (Johnson, 1968). Bagust y Clark investigaron la patogénesis de la meningoencefalitis por BHV-1 y

podieron demostrar que el virus alcanza el cerebro de las regiones nasofaríngeas y tonsilar por las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino. La mayor parte de las lesiones macro o microscópicas se observan en el sitio inicial de infección. En el sistema nervioso central las células blanco son las de Schwann, neuroglia y ganglionares. La extensión hacia el sistema nervioso no produce daños importantes, excepto en los ganglios de Gasser (Bagust y Clark, 1972)

El virus llega a las neuronas por fusión de las membranas viral y celular. Luego las nucleocápsides virales son transportadas hacia el núcleo del cuerpo neuronal, donde se establece el fenómeno de latencia. Luego de la reactivación, las partículas virales son envueltas en membranas, via aparato de Golgi, y transportadas hacia la periferia. Dos hallazgos apuntan hacia la probabilidad de que esta vía pueda ser utilizada por BHV-1. Narita y col. pudieron demostrar que luego de la inoculación intranasal, se produce una ganglionitis trigeminal, y que luego de la reactivación de BHV-1 latente también puede observarse ganglionitis trigeminal (Narita y col., 1982). De manera adicional es conocido el hecho que, durante la latencia, el ADN de BHV-1 puede ser detectado en neuronas de ganglios trigéminos y sacros (Ackermann, 1982; 1984). Durante esta diseminación neuronal el virus no está expuesto a los anticuerpos neutralizantes. La vía neural de diseminación probablemente no sólo juega un rol relevante en el establecimiento del fenómeno de latencia, sino también en la patogénesis de la meningoencefalitis en terneros.

La inoculación experimental tanto intranasal como intravaginal del virus produce generalización de la infección por el camino nervioso (Pastoret, 1982). En ambos casos la distribución del virus es bastante similar, a pesar de las diferencias en la localización dentro del sistema nervioso: el virus puede ser encontrado tanto en el cerebro como en la médula espinal cuando los animales son inoculados por vía intravaginal, pero permanece confinado al cerebro cuando son inoculados por ruta intranasal. Esto es la consecuencia de la distribución de los nervios sensoriales de los órganos periféricos.

BHV-1, como cualquier otro miembro de la familia Herpesviridae, puede utilizar puentes intercelulares para propagarse de célula a célula, evitando así el fluido extracelular. El mecanismo de expansión viral a través de puentes intercelulares no está aún clarificado. Este mecanismo de

propagación explicaría porque el virus puede ser diseminado a otras células en presencia de altos títulos de anticuerpos específicos. Este modo particular de propagación también explicaría por qué el virus puede producir placas en cultivo en presencia de anticuerpos específicos en el sobrenadante (Stevens y Groman, 1964; Zuffa y col., 1976; Aguilar-Setién y col., 1980). Pastoret y col. destacan la importancia de este mecanismo de expansión viral luego de la reactivación dado que la transmisión de célula a célula sería una estrategia que permitiría al virus evitar los anticuerpos neutralizantes (Pastoret, 1982; Roizman, 1985). La expresión de gI (homóloga a gB de HSV-1) en células bovinas transfectadas induce la fusión celular espontánea, este fenómeno contribuiría a explicar la diseminación de la infección de BHV-1 in vivo, que probablemente también se vea modificada por otros factores asociados tanto al virus como al huésped (Fitzpatrick, 1990)

La capacidad de producir infecciones latentes es una propiedad biológica común a muchos miembros de la familia Herpesviridae. Luego de una infección clínica por BHV-1, algunos muestran, pasado el periodo de convalecencia, signos de infección sin reexposición al virus. El estudio de este fenómeno es de particular interés dado que el virus puede ser reactivado por la acción de inmunodepresores y el fenómeno examinado en el huésped natural. En estudios de reactivación de BHV-1 luego de la administración de dexametasona se encontró que, poco antes de la manifestación clínica de recurrencia el virus se replica en células ganglionares (Narita y col., 1976, 1978). Este hallazgo, sumado a que el virus puede ser rescatado de ganglios trigéminos de animales clínicamente sanos por técnicas de cocultivo con células susceptibles indicaría que el ganglio trigémino podría ser un sitio donde el virus permanece en un estado latente (Homan y col., 1980). Con el propósito de indagar sobre la forma en que la infección se mantiene a pesar de la respuesta inmunológica del huésped, se investigó la presencia de ADN viral en ganglios trigéminos y sacros de animales recuperados de infecciones por BHV-1 por medio de técnicas de hibridación in situ con sondas radioactivas (Ackerman y col., 1982; 1984). Aunque con baja frecuencia, se encontraron secuencias genómicas virales en núcleos de neuronas de ganglios trigéminos y sacros.

1.5. EPIDEMIOLOGIA

La infección respiratoria se contrae por exposición a aerosoles. La meningoencefalitis y el aborto son secuelas resultantes de la infección respiratoria. No hay evidencias sobre algún vector de transmisión del virus (McKercher, 1973)

Las infecciones por BHV-1 son de fácil transmisión de un animal a otro dado que los animales infectados eliminan grandes cantidades de virus esencialmente tanto en secreciones oculares como de origen respiratorio y genital. La liberación de virus al medio a partir de animales latentemente infectados no parece ser tan abundante; de manera adicional, es limitada en el tiempo cuando se lo compara con el periodo agudo de la infección.

Otra fuente de infección es el semen. La infección genital resulta, en general a partir de exposiciones venéreas. Dado los elevados títulos virales obtenidos de aislamientos de origen seminal, en un primer momento se creyó que este hecho era sólo debido a contaminación viral de descargas prepuciales. Pero se determinó que la infección puede también ser producida por transferencia de descargas infectivas vaginales a bovinos susceptibles por varias vías como por ejemplo el uso indebido de material contaminado con virus. Algunos investigadores postulan que el virus es llevado en forma latente por animales clínicamente recuperados con exacerbaciones periódicas de la enfermedad (Kendrick, 1971). Los problemas concernientes a la contaminación a partir de semen bovino y la técnicas utilizadas para aislar virus a partir de semen de toros ha sido examinado por Kahrs. Una infección de un animal inseminado sólo ocurre si la dosis infecciosa 50 % utilizada es 10^5 por pajueta. De acuerdo a Straub una dosis infecciosa para bovino de una cepa virulenta de BHV-1 alcanza 3,2 DICT/50. Es por ello que es necesario realizar controles estrictos de semen bovino importado dado que de no hacerlo implicaría un factor de riesgo para países que, como Suiza, han erradicado exitosamente la enfermedad (Wyller, 1987).

El ganado bovino es el principal reservorio de BHV-1, aunque datos serológicos provenientes de Norte América, Australia y Europa han demostrado anticuerpos anti BHV-1 en numerosas otras especies de rumiantes salvajes pertenecientes a las familia Bovidae, Cervidae y Giraffidae (Ackermann, 1986)

El cerdo no juega un rol relevante en la epidemiología de IBR aunque, por otro lado, BHV-1 ha sido aislado de ganglio trigémino de cerdo salvaje luego de tratamiento con dexametasona (Derbyshire, 1976).

En la actualidad, la distribución de la infección es mundial y la prevalencia de reactores serológicos (40%-60%) indica que prácticamente todos los bovinos mayores de tres años han estado en contacto con el virus. A pesar de ello la presentación clínico-patológica es variable registrándose brotes de la forma respiratoria (IBR) en USA y Canadá, de forma genital, la IPV, prevalente en varios países de Europa y recientemente se han registrado importantes brotes de encefalitis y meningoencefalitis en Australia, Argentina y Gran Bretaña (Johnston y col., 1962; Gardiner y Nairn, 1964; Hill y col., 1984; Carrillo y col., 1983; Watt y col., 1981)

Las descripciones de signos clínicos y estudios de prevalencia de anticuerpos indican una amplia distribución mundial de infección por BHV-1 (Straub, 1978; McKercher, 1973). La ocurrencia de enfermedad desde baja, esporádica a enzoótica se reporta en muchos países de América, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda aunque las declaraciones de brotes no resultan tan precisas (Wylter, 1987). La amplia distribución mundial de infecciones de BHV-1 no implica una expansión uniforme de la enfermedad en todas las regiones de un país determinado. Mientras en Suiza, las regiones este y central mostraron una alta incidencia de IBR, las zonas del oeste fueron significativamente menos afectadas. También en Alemania del Este las tasas de prevalencia de IBR de anticuerpos contra BHV-1 variaron del 0 al 42 % en diferentes regiones del país. Por otro lado van Malderen y col. reportaron una expansión uniforme de IBR en Bélgica en el 62 % de 8285 lotes examinados y recientemente Bohrmann y col., reportaron un 55 % de prevalencia de anticuerpos contra BHV-1 en bovinos en la República Djibouti. La prevalencia de anticuerpos contra BHV-1 en bovinos en Escocia fue del 12 %. Las infecciones con BHV-1 pueden ser observadas a lo largo de todo el año, sin relación con una determinada estación.

La reducción y erradicación de las enfermedades asociadas a BHV-1, son metas importantes que atañen la producción ganadera. La vacunación extensiva, con vacunas a virus vivo, atenuado o inactivado, representan un método convencional de prevención a la infección con BHV-1. Uno de

los mayores problemas con que se enfrenta la implementación de los programas de vacunación contra BHV-1 es el fenómeno de latencia (Rouse y Babiuk, 1978). No solo el virus salvaje sino también el inactivado atenuado es capaz de establecer infección latente y subsecuente reactivación con eliminación del virus al medio (Pastoret y col., 1980; Nettleton y Sharp, 1980). En un informe reciente se sugirió el posible rol del virus vacunal en algunas epizootias de la enfermedad (Whetstone y col., 1986). A la luz de estas observaciones, el uso de vacunas a virus modificado ha sido cuestionado (Babiuk y col., 1987). Surgen, entonces como alternativas, otras estrategias como la utilización de vacunas a subunidades ó idiotipo anti-idiotipo aunque con éstas últimas los resultados aún son poco alentadores. Hasta ahora, no se han producido vacunas a subunidades pero los intentos de estimular la producción de anticuerpos por inoculación de fragmentos conteniendo antígenos de envoltura del virión arrojan resultados promisorios. Una vacuna a subunidades eficiente podría conferir protección y proveer la base inmunológica que permitiría diferenciar un animal infectado del vacunado (Lupton y Reed, 1980). Al ser las subunidades menos inmunogénicas que los viriones enteros requieren en general, de la utilización de adyuvantes potentes (Morein y Simons, 1985). La vacuna ISCOM BHV-1 demostró ser eficiente, poseer un buen efecto adyuvante y conferir protección contra el desafío en el conejo neocelandés (Trudel, 1987). La inmunización de bovinos con gI o gIII purificadas tanto de manera individual como combinadas, demostró inducir protección significativa contra el desafío (Babiuk y col., 1987). Ambas glicoproteínas tienen el potencial necesario que justificaría su inclusión en vacunas a subunidades, contra la enfermedad inducida por BHV-1 (Fitzpatrick, 1990).

I.6. DIAGNOSTICO Y CARACTERIZACION

Desde el punto de vista epizootiológico es relevante el hecho de que BHV-1 pueda mantenerse en un animal luego de la infección en forma latente, manifestándose ocasionalmente en la forma aguda, como lo hace HSV en el hombre. La enfermedad clínica acompañada por eliminación de virus constituye una seria amenaza para la salud del resto de los animales. En este hecho se basa la necesidad de realizar controles confiables. (Rodák, 1983)

El diagnóstico inicial se basa en la historia del animal, signos clínicos, curso de la enfermedad y lesiones patológicas. El cuadro clínico es característico y permite un diagnóstico diferencial en los estadios muy tempranos de la infección. En casos severos, IBR puede ser confirmado patológicamente. Sin embargo, ocurren epidemias en las que la sintomatología clínica es menos notoria, consistiendo en cuadros de rinitis y laringotraqueitis con descarga mucopurulenta y petequias hemorrágicas en la mucosa respiratoria.

Las técnicas clásicas utilizadas para diagnóstico de BHV-1 son el aislamiento mediante el uso de cultivo de tejidos, la detección de antígenos virales mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y, la conversión serológica. De manera adicional, es conocida la búsqueda de partículas virales y cuerpos de inclusión por microscopía electrónica.

Para aislamiento viral se utilizan cultivos de células susceptibles, en las cuales el virus produce efecto citopático característico (redondeamientos, sincicios y cuerpos eosinófilos en el núcleo). BHV-1 puede ser aislado fácilmente a partir de descargas oculares y nasales pero sólo alrededor de los 14 días post-infección. La eficiencia del aislamiento viral en casos de campo es de alrededor del 75 %. Luego de la recolección en el medio adecuado, los hisopados deben ser procesados inmediatamente.

BHV-1 produce en los cultivos que infecta antígenos nucleares y citoplasmáticos detectables por técnicas inmunohistoquímicas como inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. También puede utilizarse una inmunofluorescencia indirecta, para la detección de antígenos en secreciones nasales (Nettleton, 1984). La inmunoperoxidasa ha sido utilizada para la detección de antígenos de herpesvirus en tejidos de animales experimentalmente infectados, principalmente virus de la pseudorabia en improntas de cerebro y BHV-1 en secreciones nasales (Allan, 1985; Edwards, 1983). Por otro lado, una prueba indirecta también utilizada es el test de seroneutralización. En este caso, para la obtención de un resultado representativo deben tomarse dos muestras entre 2 y 4 semanas, para poder detectar un aumento significativo de anticuerpos. También se utiliza la inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico serológico. Un método serológico que se ha implementado en los últimos tiempos es el enzimoimmunoensayo, con la cualidad de ser un método

de realización muy simple, sensible y con la ventaja adicional de poder utilizarse sin la necesidad de cultivos celulares (Collins y col., 1984, 1985). También el radioinmunoensayo (RIA) presenta ventajas, su sensibilidad fue aumentada por la inclusión del uso de anticuerpos específicos marcados con ^{125}I contra Ig1, Ig2, IgM e IgA bovinas. Esto hizo posible no sólo determinar con alta sensibilidad qué clase de Ig están involucradas en la respuesta de anticuerpos de bovinos a la infección y vacunación, sino también evaluar su dinámica en suero y secreciones nasales (Rodak, 1983). La evaluación serológica, es particularmente importante en los casos que presentan aborto como consecuencia de la infección con BHV-1. La autólisis del tejido fetal a menudo no permite realizar un diagnóstico certero a través del examen histológico, detección de antígenos específicos, o recuperación del agente involucrado. Entonces, el suero es, a menudo, el único material que posee un laboratorio para realizar el diagnóstico (Guy, 1985). Sin embargo, el diagnóstico serológico, en estos casos, se dificulta en cuanto a la obtención de muestras pareadas en los tiempos adecuados (Eugster, 1973). De manera ideal, la primera muestra de suero debería obtenerse en un tiempo temprano durante la fase aguda de la infección y la segunda durante el periodo de convalecencia. En los casos de aborto causados por BHV-1 se carece de la primera muestra porque la infección inicial es, a menudo asintomática y puede ocurrir varias semanas antes del aborto. También se ha mencionado la hemaglutinación indirecta para diagnóstico serológico de BHV-1 (Rodak, 1973)

Investigaciones realizadas utilizando modernas biotecnologías han permitido caracterizar aislamientos de diferentes cuadros virales. Algunas de éstas son: reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales, análisis de polipéptidos y glicoproteínas y el examen del ácido nucleico viral mediante enzimas de restricción. Otros métodos serológicos convencionales como la inmunoprecipitación (IP) o la fijación de complemento han sido utilizados para la identificación de los diferentes grupos.

Los ACMs pueden ser utilizados para el diagnóstico de la infección viral y diferenciación de aislamientos. Constituyen reactivos ideales para determinar la relación antigénica entre proteínas virales relacionadas (Flammand, 1980; Wiktor, 1978). Uno de los trabajos que mejor ilustran este aspecto, fue el realizado con el virus de la rabia, con el cual se pudo establecer diferencias antigénicas entre cepas de campo y vacunales previamente consideradas indistinguibles por técnicas de serología convencional. Este hallazgo pudo explicar la falla ocasional de protección de la vacunación. Este estudio también demostró que, pequeños cambios en la antigenicidad del virus, detectables solo por ACMs tienen relevancia en la interacción virus huésped (Wiktor, 1980).

De manera similar, usando ACMs específicos para la molécula de hemaglutinina del virus de la influenza A/Russia/1/77, fue posible demostrar diferencias antigénicas entre cepas virales aisladas durante la misma epidemia de influenza. (Webster, 1979)

La relación de epitopes y la afinidad de ACMs por diferentes epitopes puede ser aplicada entonces a investigaciones epidemiológicas.

II. OBJETIVOS

La presencia de cuadros de meningoencefalitis en nuestro medio desde el año 1981, la ausencia de conocimiento sobre el tema y la relevancia de los brotes epidémicos (mas de 90 registrados hasta la fecha), nos llevaron a iniciar una línea de investigación dirigida a conocer la epidemiología molecular de BHV-1 en nuestro medio a través de la caracterización antigénica y proteica de aislamientos locales. Los objetivos específicos fueron:

1. Examinar la prevalencia de tipos (BHV-1.1/2 y BHV-1.3) en base al análisis de datos de los aislamientos con los que cuenta el laboratorio.
2. Establecer la reactividad de los virus circulantes en Argentina, Chile y Brasil con un panel de ACMs desarrollados contra cepas tipo BHV-1.1 y BHV-1.3.
3. Determinar correlación entre síndromes clínicos y/o reactividad antigénica y patrón de migración proteica
4. Desarrollar métodos de diagnóstico rápido y caracterización con anticuerpos monoclonales (ACMs)

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Cultivos celulares

Se utilizaron células de la línea Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) y cultivos primarios de testículo y riñón fetal bovino. Las células fueron propagadas en medio esencial mínimo (MEM) Eagle con antibióticos y 10 % de suero fetal bovino. La concentración de suero fue disminuida al 2 % en el medio de mantenimiento y utilizado para la producción viral.

III.2. Aislamiento viral

Se inocularon homogenatos de cerebro, hígado, bazo, riñón, y ganglios retrofaríngeos resuspendidos en MEM. Los cultivos inoculados fueron controlados diariamente a fin de detectar efecto citopático. Los aislamientos fueron identificados con el número de protocolo correspondiente y almacenados en nitrógeno líquido luego del tercer pasaje.

Los aislamientos de BHV-1 que se incluyeron en este estudio y algunos datos relevantes están incluidos en la tabla N° 1.

Las cepas Los Angeles (LA) y A-663 fueron incluidas como referencia, representando los tipos 1.1 y 1.3 respectivamente.

Los aislamientos seleccionados para su caracterización fueron efectuados en células MDBK. Los títulos de infectividad observados variaron entre 10^6 y $10^{7.50}$ DICT₅₀/ml

TABLA 1: Aislamientos de BHV-1 realizados en Argentina, Chile y Brasil incluidos en el estudio

CEPA	OBTENIDO DE	SIGNOS CLINICOS	PAIS	AÑO
LA*	tracto resp.	respiratorio	E. E. U. U.	1956
A-663*	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1982
A-768	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1982
A-771	higado	encefalitis	ARGENTINA	1982
A-898	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1983
A-774	bazo	aborto	ARGENTINA	1983
A-70	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1984
A-232	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1984
A-200	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1984
A-89	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1984
A-5	cerebro	encefalitis	ARGENTINA	1985
A-75	hisop. prep.	genital	ARGENTINA	1985
A-194	hisop. vag.	genital	ARGENTINA	1986
A-107	higado fetal	aborto	ARGENTINA	1986
A-170	hisop. prep.	genital	ARGENTINA	1989
A-202	hisop. prep.	genital	ARGENTINA	1989
A-52	pool SN	SR	ARGENTINA	1989
A-54	pulmón	SR	ARGENTINA	1989
A-41	hisop. vag.	genital	ARGENTINA	1989
A-67	hisop. oc.	conjuntivitis	ARGENTINA	1989
Ch-1	tracto resp.	respiratorio	CHILE	1977
Ch-2	feto	aborto	CHILE	1985
Ch-3	epitelio bucal	SR	CHILE	1979
Br-35	pulmon	respiratorio	BRASIL	1990
Br-136	cerebro	encefalitis	BRASIL	1989
Br-56	hisop. prep.	genital	BRASIL	1990

SR: sin registro

hisop. oc. vag. y prep.: hisopado ocular, vaginal y prepucial

resp.: respiratorio

pool SN: pool sistema nervioso

*: prototipo de BHV-1.1 y BHV-1.3 respectivamente

III.3. Anticuerpos monoclonales (ACMs)

Los procedimientos para generar y caracterizar los hibridomas contra la cepa neumotrópica LA y la encefalitogénica N569 (BHV-1.3), han sido descriptos anteriormente (Metzler, 1987). Entre los sobrenadantes de los hibridomas producidos con LA los Nrs. 1240 y 140 reaccionan con todos los tipos de BHV-1, mientras que el Nr. 60 y el 131 no reaccionan con cepas encefalitogénicas (BHV-1.3). Por otro lado todos los ACMs producidos con la cepa australiana N569 (Nrs. 2915, 2514 y 1624) sólo reconocen epitopes presentes en variantes del tipo 3.

III.4. Inmunoperoxidasa para caracterización de aislamientos

Para evaluar la reactividad de los ACMs con los aislamientos virales, se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre células MDBK infectadas con cada uno de los aislamientos. Cuando se visualizo efecto citopático, las laminillas infectadas con cada una de las cepas fueron fijadas en acetona a -20°C durante 20 min. Los antígenos virales se detectaron utilizando sobrenadantes puros de los hibridomas Nr. 141, 60 y 2915. Luego de una incubación durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, se realizó una incubación de 1 hora con el conjugado antiración-peroxidasa (DAKO) diluido 1/300 en solución buffer salina (PBS) pH 7.2, conteniendo 1% de seroalbúmina bovina (BSA). Luego de 3 lavados de 10 min. posteriores a cada periodo de incubación, la presencia de antígeno viral se reveló con una solución de 3-3' diaminobencidina disuelta en buffer Tris-HCl (30 mg/100 ml; pH 7.6 conteniendo 0.01% de H_2O_2). La reacción se detuvo mediante un lavado con PBS y otro posterior con H_2O destilada.

Utilizando un panel básico de 3 ACMs (141, 60 y 2915) fue posible identificar BHV-1.3 de los otros tipos. La caracterización antigénica de algunos aislamientos se confirmó con 3 ACMs adicionales (131, 1624 y 2514).

III.5. Infección y marcado de células

Monocapas preconfluentes de células MDBK sembradas en frascos plasticos descartables (25 cm^2) fueron infectadas con cada uno de los aislamientos en estudio con una multiplicidad de infección de 5. Paralelamente se utilizaron células sin infectar como control negativo. Luego de 1 h. de adsorción, se realizaron 3 lavados con PBS y se agregaron 4 ml de medio conteniendo 1/10 de la concentración usual de metionina y 2 % de suero fetal bovino. Se incubaron las monocapas durante 8 h a 37°C ; luego se agregaron 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina (New England Nuclear, NEN; actividad específica 1186.0 Ci/mmol) a cada frasco. Luego de una incubación a 37°C durante toda la noche, se cosecharon las células marcadas.

III.6. Preparación de muestras para electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron 3 lavados en cada una de las monocapas con PBS, y se cosecharon en 5 ml de PBS. Luego fueron transferidas, de manera individual, a tubos en los que se las centrifugo por 3 min. a 3000xg. Se descartó el sobrenadante, y resuspendió el pellet en 0.5 ml de buffer muestra (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, conteniendo 3 % de duodecil sulfato de sodio -SDS-, 1 % de 2-mercaptoetanol, 15 % de glicerol y 0.01 % azul de bromofenol). Las muestras fueron incubadas durante 3 min. a 100°C y conservadas a -20°C hasta ser corridas.

III.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferencia y exposición

Se prepararon geles al 10 % en presencia de SDS de acuerdo a procedimientos previamente descritos (Laemmli, 1970) en un aparato vertical Hoefer SE 400. Luego de la electroforesis (20 mA para geles de 1.5 mm), se realizó una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (NC) (BA 85 de Schlecher y Schuell) para obtener una mejor definición de las bandas. Para ello se colocó el gel de poliacrilamida, conteniendo las proteínas, sobre una lámina de papel de filtro. La cara descubierta del gel se cubrió con una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la nitrocelulosa se cubrió con una lámina de papel de filtro. Ambas hojas de papel de filtro conteniendo el gel y la nitrocelulosa fueron colocadas entre almohadillas sostenidas por soportes plásticos. El conjunto entero se ubicó en una cuba de transferencia (Hoefer TE 50) conteniendo buffer de transferencia (20 mM Tris HCl, 150mM glicina pH 8), refrigerada con agua corriente, de manera tal que la nitrocelulosa enfrentara el ánodo. El voltaje aplicado fue de 3 v por cm durante toda la noche. Las proteínas que, por efecto del SDS se cargaron negativamente, fueron transferidas electroforéticamente del gel a la membrana de nitrocelulosa. Concluida la transferencia se retiró la membrana de nitrocelulosa y se lavó con agua destilada, dejándola luego secar entre papeles de filtro. Una vez seca esta membrana, se expuso a una película Kodak X-OMAT AR,

durante 72 hs a -70°C . Los polipéptidos inducidos por cada uno de los aislamientos fueron numerados de acuerdo a descripciones previas (Metzler, 1985-1986). Se incluyeron marcadores de peso molecular en cada corrida.

En base a la conducta migratoria de algunas proteínas en especial las vp9, vp17A, vp30 que poseen patrón de migración tipo específica fue posible identificar BHV-1.3 de los otros tipos.

III. 8. Inmunoprecipitación (IP)

Se procedió igual que para infección y marcado de células hasta obtener las células infectadas con cada uno de los aislamientos y no infectadas, lavadas, en el tubo de centrifuga. Se resuspendió el precipitado de cada frasco plástico en 2 ml de buffer RIP (140 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Tritón X-100, pH 7,3) y homogeneizó. Cada uno de los aislamientos fue tratado de manera individual. Se realizó una centrifugación durante 90 min. a 100000xg y se utilizó el sobrenadante (0,2 ml por 5 ul de cada suero evaluado), se homogeneizó e incubó toda la noche a 4°C . Se agregaron 35 ul de Proteína G-Sepharosa en buffer RIP de manera individual. Se incubó 60 min., resuspendiendo la sefarosa cada 10 min. Se lavaron los inmunocomplejos 5 veces con buffer RIP y se centrifugaron las esferas de Sepharosa por tiempos cortos. Luego del lavado final se retiró completamente el posible resto de buffer RIP y se resuspendieron los inmunocomplejos en 65 ul de buffer muestra. Se incubó por 3 min. a 100°C . Se homogeneizó 1 ó 2 veces durante la incubación para permitir que el SDS acceda a los inmunocomplejos. Se centrifugó por un tiempo corto y se mantuvieron las muestras a 4°C hasta la corrida.

III. 9. Inmunoblotting (IB)

Se incubó la nitrocelulosa donde se habían transferido las proteínas en el buffer bloqueo al 5% (BB₁-5-50 mM Tris- HCl, pH 7,4; 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, Nonidet P40 0,05 %, suplementado con 1-5 % de leche descremada). Se lavó con BB₁. Se incubó con el anticuerpo primario (diluido 1:100 en BB₁) por 2 hs. Luego de 3 lavados de 5 min. con BB₁ se incubó con conjugado antibovino-peroxidasa diluido en BB₁ (1:100) por una hora. Se lavó nuevamente e

incubó con el sustrato por 15 min. (cloronaftol, 0,3 % metanol en PBS con H₂O₂ al 0,01 %). La reacción se detuvo con 3 lavados de 5 min. con agua corriente.

III. 10. Desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido

Se utilizaron 10 cerebros de bovinos con signos neurológicos enviados al laboratorio para diagnóstico virológico convencional en cultivo de tejidos. BHV-1 fue aislado del cerebro de 7 animales y de hígado o bazo de los 3 restantes. Los cerebros fueron obtenidos de terneros, durante diferentes epizootias de encefalitis, y fueron almacenados hasta 12 meses a -70°C para su posterior estudio. Por otro lado se utilizaron 10 cerebros obtenidos de bovinos de matadero libres de virus detectable por cultivo de tejido que fueron incluidos como controles negativos.

Se realizaron improntas de alrededor de 1 a 2 cm² de tejidos de 3 zonas de la corteza cerebral (frontal, parietal y occipital) sobre portas limpios y desengrasados. Luego del secado, se fijaron en acetona fría y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. Los antígenos virales fueron detectados con el método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), utilizando los sobrenadantes de cultivos de hibridoma Nr. 141 (diluido 1:10), suero de conejo anti-ratón (diluido 1:50) y PAP ratón (diluido 1:50). Los tiempos de incubación a 37°C en cámara húmeda fueron 2 horas, 30 min. y 30 min. respectivamente. Todos los reactivos fueron diluidos en BSA 1 % en PBS. La presencia de antígenos virales se reveló incubando las improntas por 30 min. en la solución de diaminobencidina descrita anteriormente. La observación microscópica se realizó a 100 y 250 aumentos sin tinción de contraste. La reacción se consideró positiva si era posible identificar neuronas conteniendo tinción marrón en su citoplasma y procesos dendríticos como axonales.

III.11. Caracterización viral a partir de improntas de cerebro

La reactividad de 2 ACMs adicionales (Nrs. 1240 y 131) con antígenos de BHV-1 presentes en improntas de cerebros fueron evaluados con el mismo protocolo de inmunoperoxidasa descrito. Se incluyeron células de riñón de feto bovino infectadas con las cepas LA y A-663, ambas consideradas como prototipos de cepas neumotrópicas y neurotrópicas respectivamente (Metzler, 1986). Se utilizaron los ACMs 1240 diluido 1/10 y 131 1/2.

IV. RESULTADOS

IV. 1. ANALISIS DE LAS CEPAS AISLADAS EN ARGENTINA

Se confecciono un registro de datos de interés de los aislamientos con los que cuenta el laboratorio, donde se incluye el año en que se realizó el aislamiento, cuadro clínico, localidad, ubicación, etc. Luego, se realizó un análisis de los datos correspondientes al periodo 1982-1990. En la fig. 3 se presenta el total de aislamientos realizados por año y en detalle los valores correspondientes a los diferentes signos clínicos (nervioso, aborto, genital y respiratorio). Con ND se agrupan los aislamientos provenientes de animales con signología no determinada.

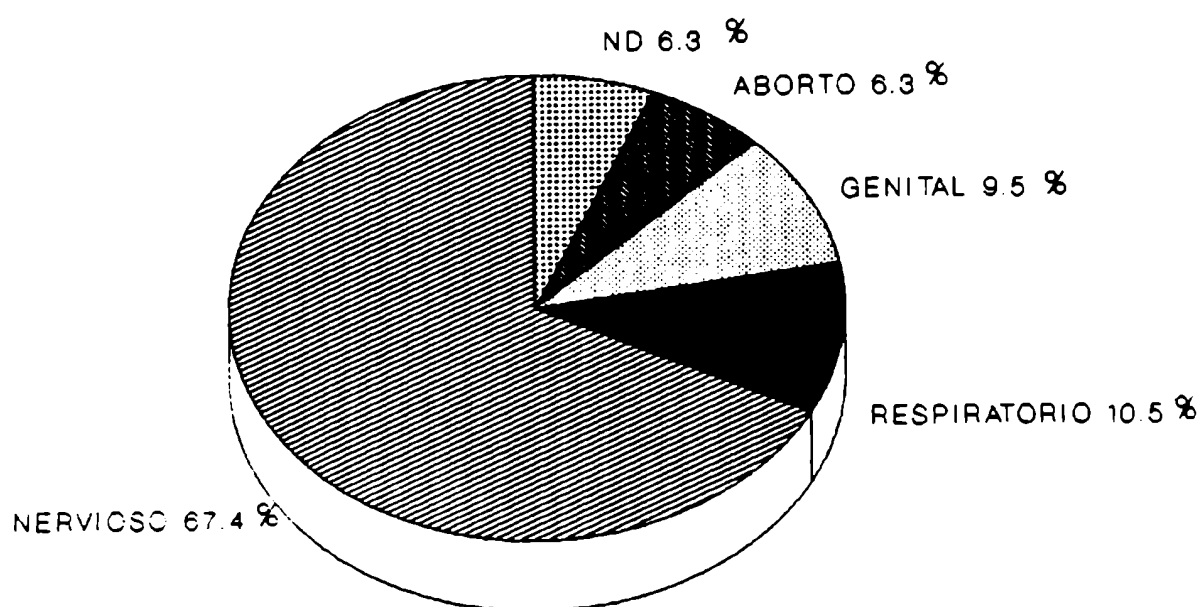
FIGURA 3. Distribución de aislamientos a lo largo del periodo 82/90

Signos clínicos	Años									T
	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
Nervioso	4	5	10	10	11	10	8	4	2	64
Aborto	-	2	-	-	2	-	1	-	1	6
Genital		-	-	2	2	-	2	3	-	9
Respiratorio			1	-	-	2	-	6	1	10
ND			-		2	1	1	1	1	6
Total de aislamientos realizados	4	7	11	12	17	13	12	14	5	95

ND: no determinado

El número de aislamientos analizados sugieren el cuadro epidemiológico de la región. En la fig. 3a se encuentra representado el porcentaje de aislamientos locales de BHV-1 de bovinos de acuerdo a los diferentes signos clínicos correspondiendo el 67,4 a signos nerviosos; el 9,47 % fue aislado de cuadros genitales y una menor proporción (10,5 %) de cuadros respiratorios y abortos (6,3 %). Un porcentaje similar (6,3) corresponde a aislamientos provenientes de cuadros con signología no determinada. En casi todos los casos el virus fue aislado de cerebro, ocasionalmente del ganglio de Gasser, médula espinal, cornete nasal, bazo, hígado, pulmón y riñón. También se aisló BHV-1 de hisopados y lavados prepuciales de machos adultos con balanopostitis; hígado y pulmón de fetos abortados e hisopados nasales de animales con enfermedad respiratoria.

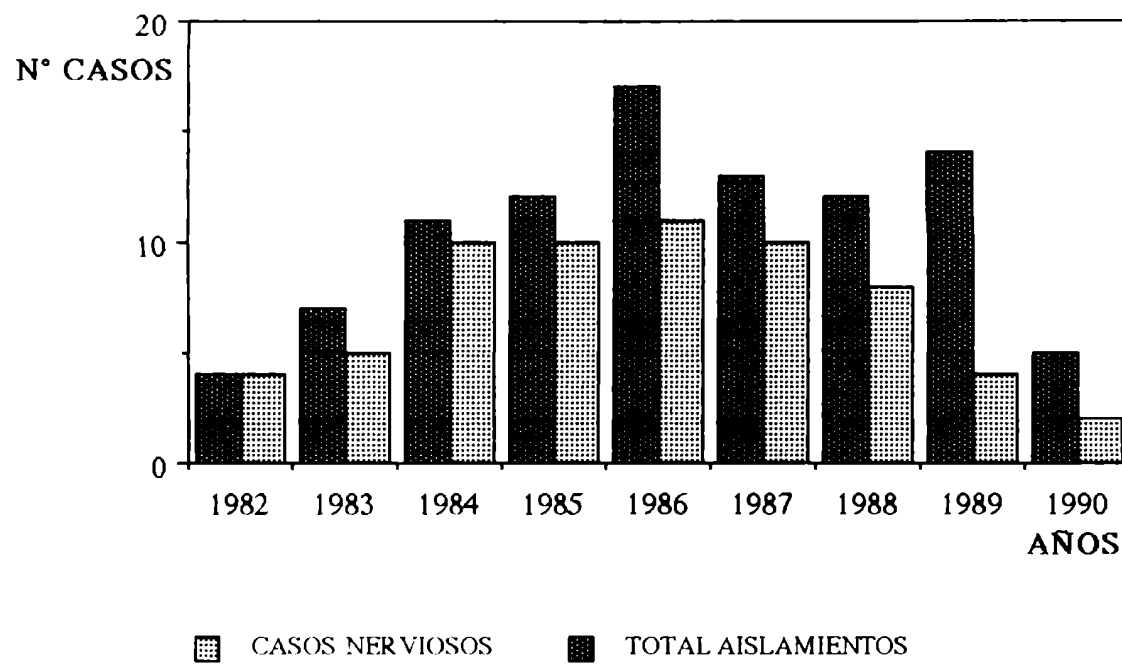
FIGURA 3a. Porcentaje de aislamientos realizados en nuestro medio de acuerdo a los signos clinicos



En la fig. 3b se ha graficado, en forma de barra, la distribución de BHV-1 en el periodo 82-90 en Argentina donde se encuentra representado el número de aislamientos provenientes de animales con signos nerviosos sobre el total de aislamientos realizados por año.

A partir de este análisis puede decirse que BHV-1 está presente a lo largo de todos los años y es de destacar que del total de aislamientos realizados en cada uno de los años, el porcentaje de aquellos obtenidos de bovinos con signos nerviosos caracterizados por encefalitis, fue mayor al 50, aunque esta relación se invierte en los años 1989 y 1990. Con respecto a esta última observación, debe considerarse que a partir del 1989 los ingresos de material para diagnóstico no ocurren en forma regular debido a la apertura de laboratorios privados que absorbieron, en parte, el diagnóstico virológico.

Como se desprende del registro de ingresos en general pudo observarse mayor número de casos nerviosos reportados que aquellos obtenidos de animales con otros signos. Este hecho puede asociarse a la espectacularidad en que se presenta la forma neurológica ya que en el caso de encefalitis la situación es fatal, sin excluirse una mayor frecuencia de casos clínicos.

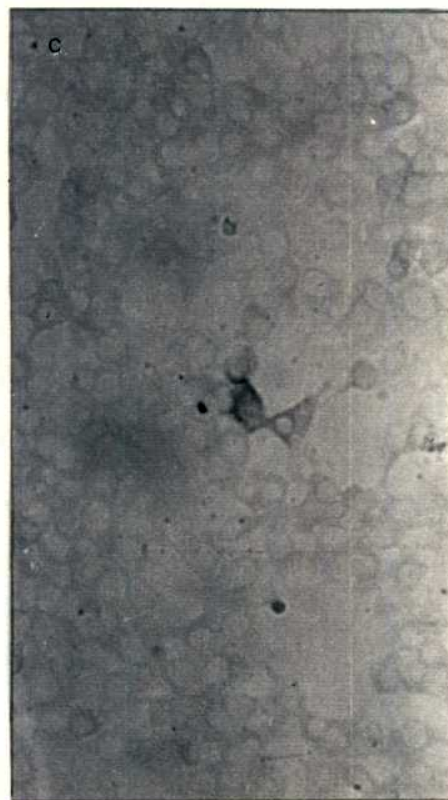
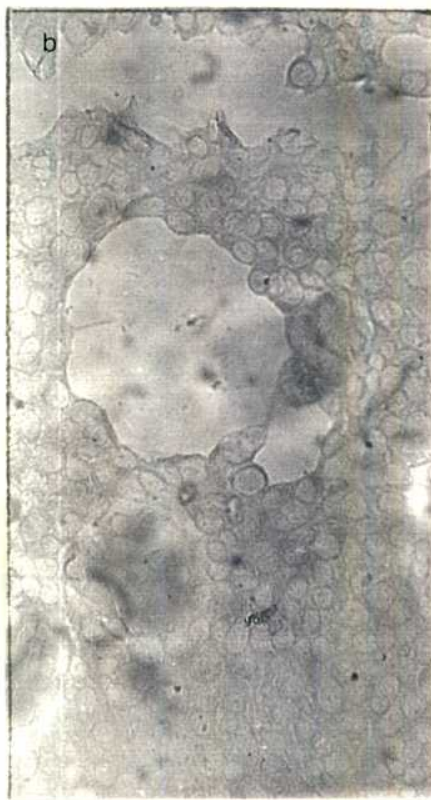
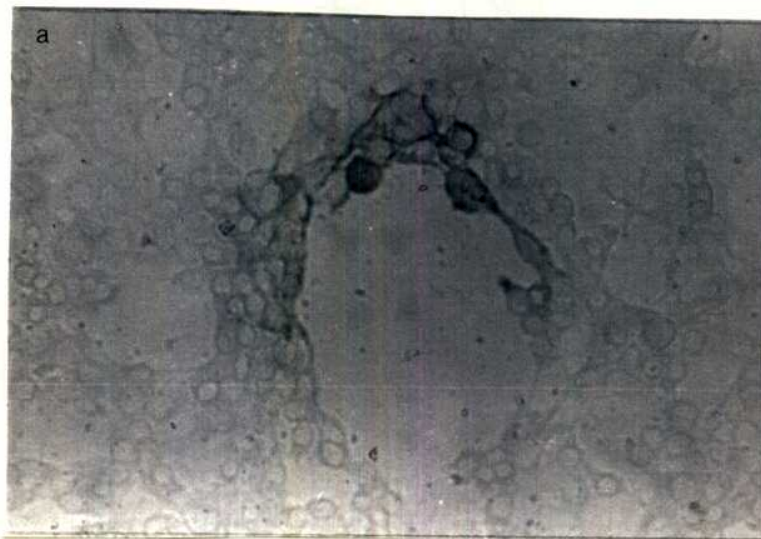
FIGURA 3b. Casos nerviosos con respecto al total de aislados durante en periodo 82/90

IV.2. CARACTERIZACION DE AISLAMIENTOS

La reactividad de los ACMs con estos virus se determinó por inmunoperoxidasa indirecta utilizando células infectadas in vitro, con cada uno de los aislamientos, como sustrato antigénico.

Los ACMs 141 y 60 fueron generados con la cepa LA y el Nr. 2915 con la cepa australiana N569 también originada de un caso de encefalitis, o sea que ambos ACMs permitieron distinguir los aislamientos pertenecientes al tipo 3 de aquellos que no lo eran, dado que el ACM Nr. 60 no reconoce el epítotope en los aislamientos tipo 3 mientras que el ACM Nr. 2915 sólo es reactivo con los virus que responden a este patrón. (fig. 4)

FIGURA 4. Células MDBK infectadas con el aislamiento 107 mostrando distinta reactividad con los ACMs a. 141, b. 60, c. 2915



IV.2.1. ANALISIS DE REACTIVIDAD DE ANTIGENOS INDUCIDOS POR CADA UNA DE LAS CEPAS

Con el fin de efectuar la caracterización de aislamientos y poder realizar un estudio epidemiológico a nivel molecular se examinó la reactividad de aislamientos de BHV-1 provenientes no sólo de Argentina (obtenidos en el periodo 1982-1990), sino también de Chile y Brasil. De aquellos obtenidos de Argentina se seleccionaron 1-3 aislamientos de distintos años del periodo analizado.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la caracterización antigénica utilizando un panel de anticuerpos monoclonales en un ensayo de inmunoperoxidasa indirecta. Todos los aislamientos estudiados fueron reactivos con el ACM Nr. 141, lo que indicaba que pertenecían al grupo BHV-1.

Entre los aislamientos estudiados, 7 de 8 provenientes de Argentina y 1 de 1 proveniente de Brasil, todos ellos aislados de bovinos con signos nerviosos, mostraron patrón tipo BHV-1.3. Diez de 12 casos no neurológicos provenientes tanto de Argentina, Chile como de Brasil exhibieron características BHV-1.1/2. Seis de 6 aislamientos genitales y 1 de 3 obtenidos de fetos abortados mostraron patrón tipo BHV-1.1/2.

TABLA 2 Reactividad de aislamientos de BHV-1 con ACMs revelado con una prueba de inmunoperoxidasa indirecta sobre células infectadas. Las cepas LA y A-663 fueron utilizadas como referencia.

CEPAS	REACTIVIDAD CON ACMs#			PATRON IDENTICO A	
	141	60	2915	BHV-1.1/2	BHV-1.3
LA	+	+	-	+*	
A-663	+	-	+		+*
A-768	+	-	+		+*
A-771	+	-	+		+*
A-898	+	+	-	+*	
A-774	+	-	+		+*
A-70	+	-	+		+*
A-232	+	-	+		+*
A-200	+	-	+		+*
A-89	+	-	+		+*
A-5	+	-	+		+*
A-75	+	+	-	+	
A-194	+	+	-	+	
A-107	+	-	+		+
A-170	+	+	-	+	
A-202	+	+	-	+*	
A-52	+	-	+		+
A-54	+	-	+		+*
A-41	+	+	-	+	
A-67	+	+	-	+	
Ch-1	+	+	-	+*	
Ch-2	+	+	-	+*	
Ch-3	+	+	-	+	
Br-35	+	+	-	+	
Br-136	+	-	+		+*
Br-56	+	+	-	+*	

#ACM Nr. 141 reacciona con BHV-1.1/2 y BHV-1.3

ACM Nr. 60 reacciona solo con BHV-1.1/2

ACM Nr. 2915 reacciona solo con BHV-1.3

* Confirmado con ACMs Nr. 131, reactivo con BHV-1.1/2, y 1624 y 2514 reactivos exclusivamente con BHV-1.3

IV.2.2. ANALISIS DE PROTEINAS VIRALES METABOLICAMENTE MARCADAS

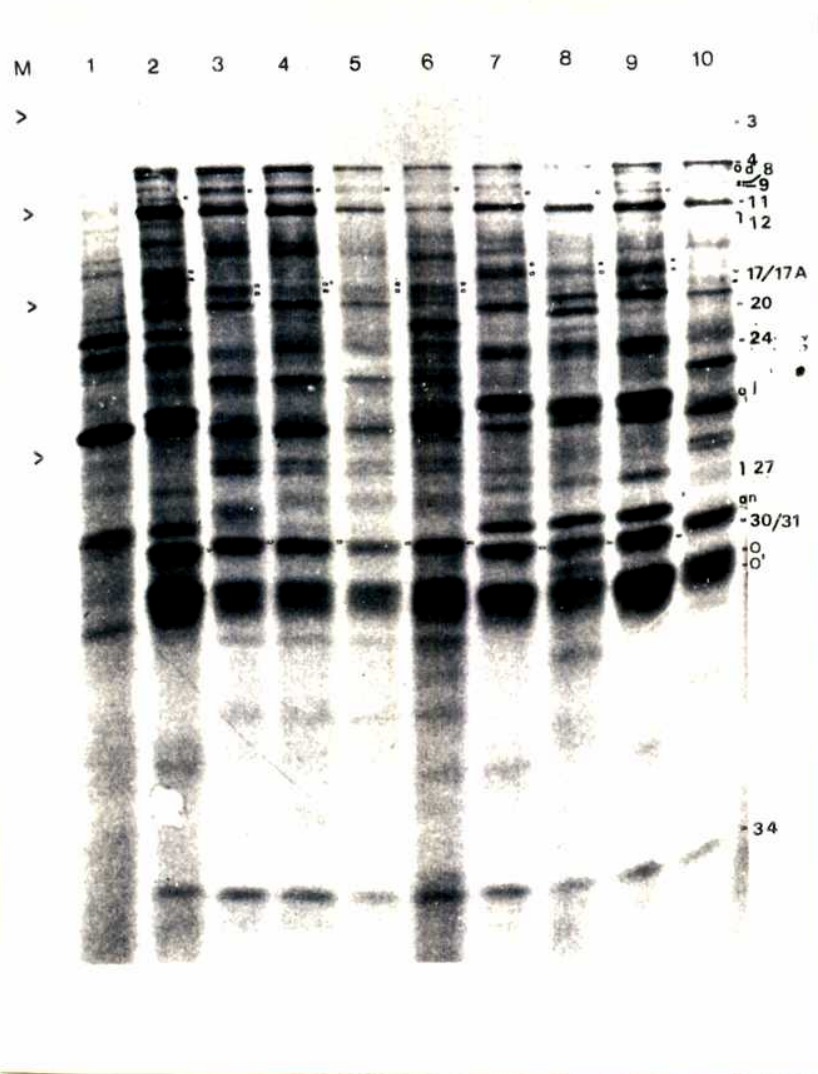
El estudio de polipeptidos inducidos por la infección de los distintos aislamientos se implementó con el objetivo de completar estudios previos y así poder definir más finamente la prevalencia de variantes de BHV-1 en diferentes regiones de Sudamérica.

Con el fin de comparar los perfiles proteicos de diferentes aislamientos, se examinaron 4 aislamientos argentinos (3 pertenecían a BHV-1.3 y un caso genital (BHV-1.1/2), un aislamiento chileno (tipo BHV-1.1/2) y dos brasileños (cada uno de ellos representando diferentes tipos), (fig.5, calles 2 a 10). También se incluyeron células sin infectar, material que se corrió en paralelo como control negativo (fig. 5, calle 1).

Metzler y colaboradores, han mostrado que las vp 9 y 17A migran más rápido mientras que la vp30 tiene mayor peso molecular en las cepas que responden al patrón tipo BHV-1.3. (Metzler, 1986)

En base a los perfiles proteicos observados y de acuerdo a la conducta de migración relativa, fue posible distinguir aquellos aislamientos pertenecientes al tipo BHV-1.3 (A-232, A-70, A-5 y Br-136) de los que responden al tipo BHV-1.1/2 (A-202, Ch-1, Br-56)

FIGURA 5 Perfil proteico de aislamientos provenientes de Argentina, Chile y Brasil



Calles: 1. Celulas sin infectar; 2. LA; 3. A-663; 4. 232; 5. 70; 6. 5; 7. 202; 8. CH-1; 9. BR-56; 10. BR-136.

Las flechas indican la posición de marcadores de PM: Miosina 205000; Fosforilasa 97000; BSA 69000; OVA 46000.

IV.2.3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS AISLAMIENTOS ANALIZADOS

En base a los datos de procedencia y los resultados de caracterización y se confeccionó un mapa con la ubicación de los más de 90 aislamientos obtenidos en nuestro país y aquellos provenientes de Chile y Brasil (fig. 6)

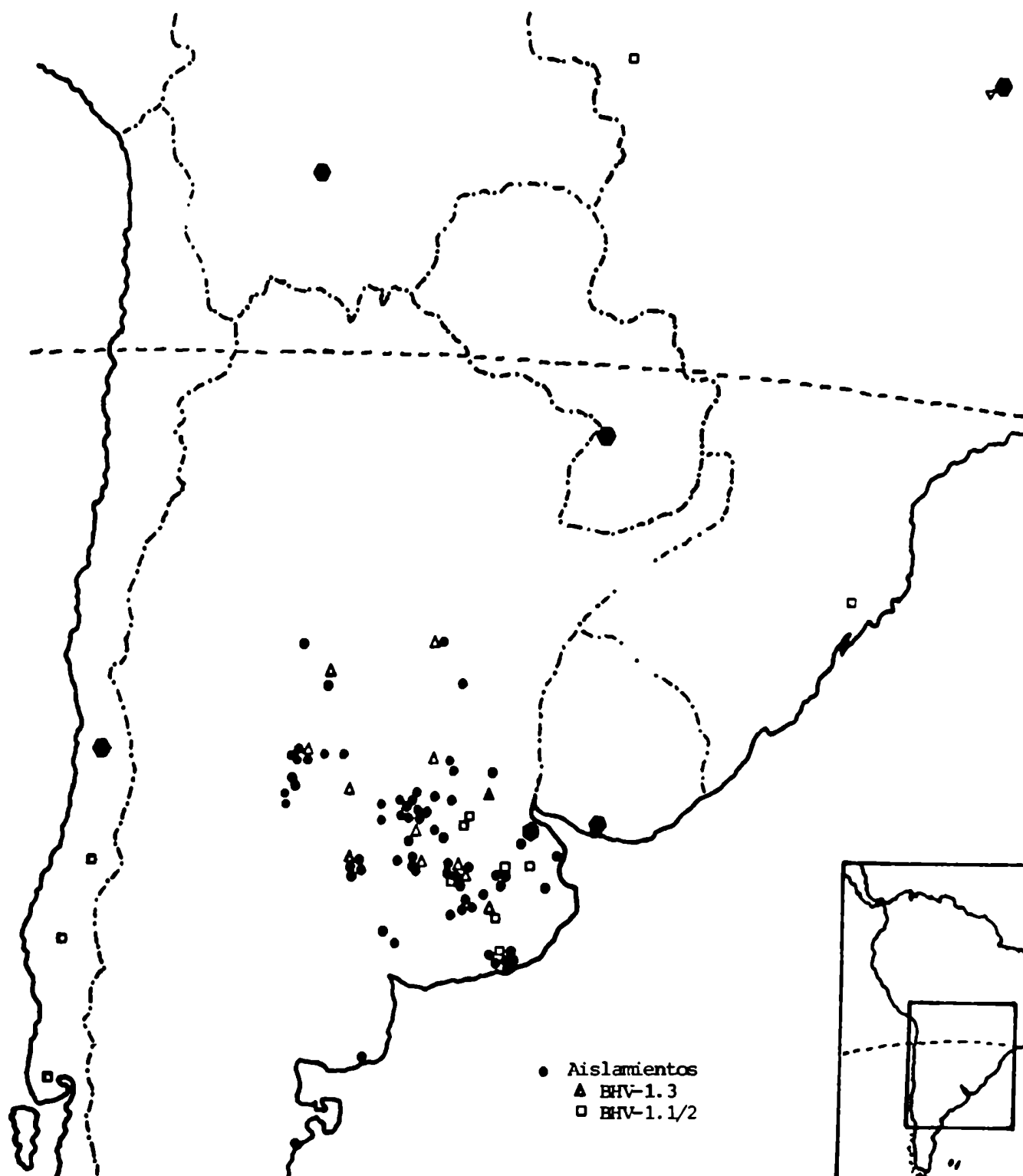
Con respecto a los aislamientos provenientes de Brasil, el BR-136, constituye el primer caso de encefalitis a partir del cual se aisló BHV-1 en ese país, aunque previamente se había reportado la forma neurológica con lesiones histológicas encefalíticas. Esto sugiere, como algunos autores lo han mencionado, una mayor incidencia de la forma encefalítica de IBR en el sur de Brasil. El aislamiento BR-56, fue obtenido a partir de una epidemia de balanopostitis aguda de toros de una estación de inseminación artificial, lo que sugeriría que esta enfermedad es más importante en la misma región de lo que se pensaba previamente.

Con respecto a los aislamientos provenientes de Chile, si bien el análisis se realizó en base a un número pequeño de aislamientos, los datos sugieren ausencia de BHV-1.3 en ese país.

Los aislamientos originarios de Argentina provienen en su mayoría de la provincia de Buenos Aires, Córdoba y en menor proporción de Santa Fé, La Pampa y Entre Ríos en ese orden.

Como puede observarse, en nuestro país circulan todos los tipos, aquellos con características BHV-1.3 se confinaron principalmente en la zona central de la provincia de Buenos Aires y del país, mientras que los que presentaron características BHV-1.1/2 se distribuyeron en la periferia de la misma provincia.

FIGURA 6 Distribución de aislamientos provenientes de Argentina, Chile y Brasil



IV.2.4. RELACION ENTRE TIPOS Y ENTIDADES CLINICAS

Si bien el número de aislamientos obtenidos de casos respiratorios y abortos no son suficientes como para establecer relaciones, pudo determinarse que de 10 casos analizados provenientes de bovinos con enfermedad neurológica 9 respondieron al tipo BHV-1.3, mientras que todos los casos obtenidos de la forma genital exhibieron patrón tipo BHV-1.1/2.

FIGURA 7 Asociación entre tipos de BHV-1 y entidades clínicas

TIPO	BHV-1. 1/2	BHV-1.3
SIGNOS CLINICOS		
neurológicos	1	7
respiratorios	2	1
genitales	6	
abortos	1	2

IV.2.5. ANALISIS DE AISLAMIENTOS LOCALES CON PATRON BHV-1.3

Dada la importancia de BHV-1.3 en nuestro medio, una variante no reconocida previamente, se eligieron cuatro aislamientos representativos (A-663, A-200, A-5 y A-89) que respondieron a este tipo a través del análisis antigénico y proteico aislados de bovinos con enfermedad neurológica, y otro perteneciente a BHV-1.1, A-898, aislado de un cuadro con las mismas características, con el fin de establecer la relación antigénica e inmunogénica entre los diferentes virus.

En primer lugar se compararon sus perfiles proteicos a través de un SDS-PAGE (fig. 8). Como se ha mencionado previamente la conducta migratoria relativa de las vp9, vp17A y vp30 permitieron identificar a estos aislamientos (A-200, A-5, A-89) como pertenecientes al tipo BHV-1.3 dado que sus perfiles proteicos fueron indistinguibles de A-663 utilizado como referencia, a diferencia de A-898 que presentó características BHV-1.1/2.

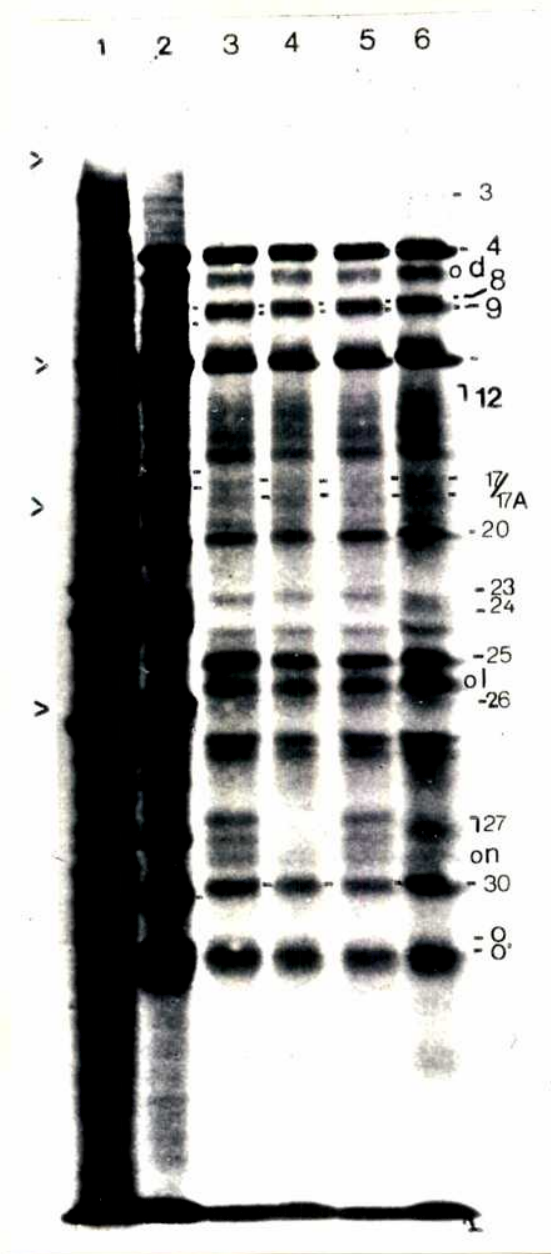
Al disponer de antisueros bovinos homólogos se realizaron, con los mismos aislamientos, ensayos de IP e IB.

Para la IP se utilizaron 2 sueros, uno de ellos, el A, anti-A-663 (BHV-1.3) y otro E obtenido luego de una reactivación de una infección latente con la cepa Jura (BHV-1.1)

En la IP solo podrán identificarse aquellas proteínas contra las que reaccionan los anticuerpos presentes en el suero. Como puede observarse, muchas proteínas no pueden detectarse con ambos sueros, cuando se compara con el material control, sin inmunoprecipitar. Esto puede deberse tanto al antígeno como al suero que se este utilizando, o de con que eficiencia la proteína G se una a las inmunoglobulinas bovinas. El control sin inmunoprecipitar indica la presencia del antígeno. Por otro lado la reacción fue específica con ambos sueros ya que ninguno precipitó proteínas celulares. El suero anti A precipita con mayor eficiencia proteínas inducidas por el aislamiento A-898 que aquellas inducidas por el virus homólogo y los otros aislamientos pertenecientes al mismo tipo, mientras que el suero anti E precipitó con igual eficiencia proteínas inducidas por los diferentes tipos (fig. 9)

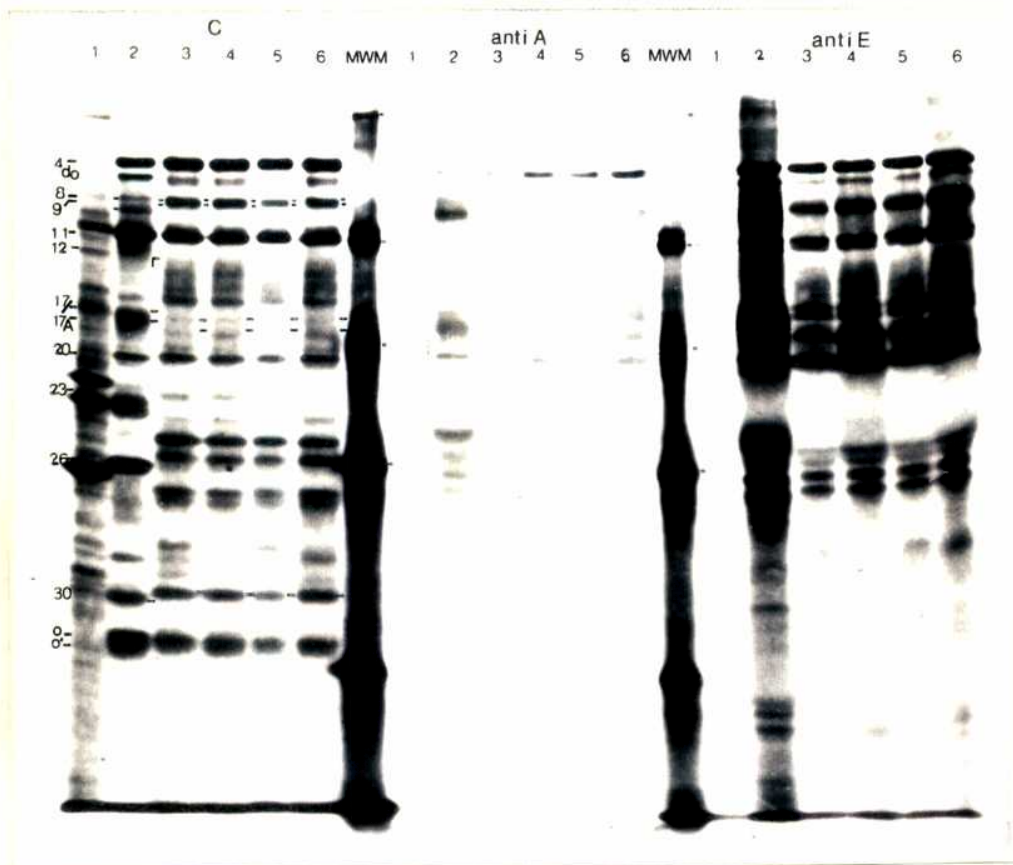
El IB permite, al utilizar un buffer desnaturizante identificar aquellos determinantes antigenicos asociados a la estructura primaria. La desnaturalización puede tener doble efecto, hacer perder o exponer epitopes haciéndolos accesibles a los anticuerpos presentes en el suero. En el ensayo A y B se utilizaron 2 sueros anti BHV-1.1 y en C el mismo suero anti-BHV-1.3 utilizado para IP. Nuevamente los controles demuestran la especificidad de los sueros evaluados. Si bien los datos obtenidos en este ensayo no agregan información adicional confirman hallazgos previos, demostrando que el suero A en general fue menos eficiente que ambos E dado que la reactividad con todos los aislamientos fue escasa, mientras que los sueros anti BHV-1.1 reconocieron con mayor eficiencia epitopes de la cepa homóloga que de los virus heterólogos. Adicionalmente puede observarse diferencias individuales entre los sueros anti-BHV-1.1, siendo más eficiente el utilizado en el ensayo B (fig. 10)

FIGURA 8 Perfil proteico de aislamientos argentinos con patrón BHV-1.3



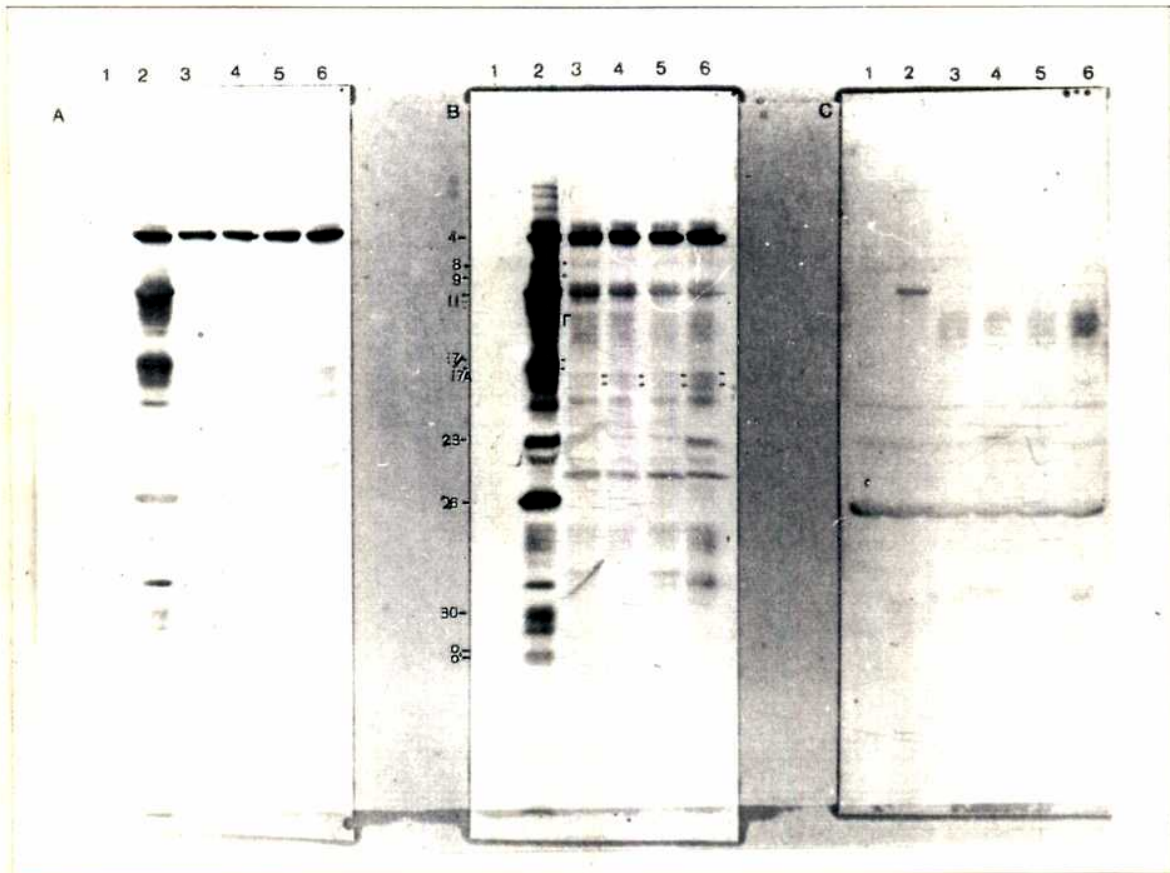
Calles: 1. Células sin infectar; 2. 898; 3. 5; 4. 89; 5. 200; 6. A-663. Las flechas indican marcadores de PM: miosina: 205000; fosforilasa: 97000; BSA: 69000; OVA: 46000

FIGURA 9 Inmunoprecipitación de aislamientos argentinos con patrón BHV-1.3



Control: Sin inmunoprecipitar con 20000 cpm; Anti A: Anti A-663 (BHV-1.3); Anti E: Anti JURA (BHV-1.1).
 Calles: 1. Células sin infectar; 2. 898; 3. 5; 4. 89; 5. 200; 6. A-663. MWM: marcadores de PM: miosina: 205000;
 fosforilasa: 97000; BSA: 69000; OVA: 46000

FIGURA 10 Inmunoblotting de aislamientos argentinos con patrón BHV-1.3



Sueros: A. Anti JURA (BHV-1.1)- T-; B. Anti JURA (BHV-1.1)- L-; C. Anti A-663 (BHV-1.3)
Calles: 1. Células sin infectar; 2. 898; 3. 5; 4. 89; 5. 200; 6. A-663

IV.2. INMUNOPEROXIDASA COMO METODO DIAGNOSTICO RAPIDO

IV.2.1. DETECCION DE ANTIGENOS DE BHV-1

Se examinaron improntas de cerebro, de los cuales se había aislado BHV-1. La tinción marrón de citoplasma y procesos axonales y/o dendríticos de las neuronas, reveló la presencia de antígeno. Una imagen similar se observó en preparaciones realizadas a partir de cerebros obtenidos de 3 bovinos de los cuales se había aislado virus a partir de hígado o bazo pero no de cerebro (tabla 3). No se detectó tinción específica en neuronas de improntas realizadas de cerebros bovinos utilizados como controles negativos. El número de células teñidas fue de 1 o 2 a cientos por portaobjeto. En la mayoría de los casos, las células teñidas formaban grupos rodeados por grandes áreas libres de tinción de fondo.

TABLA 3 Resultados de aislamiento viral y detección de antígenos de BHV-1 por inmunoperoxidasa en muestras de cerebro

ACMs utilizados	cepas virales ^o		ternero N ^o											
en PAP (N ^o) ^a	LA	A-663	1-10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
141	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1240	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
131	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
aislamiento														
viral				+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

^a Se utilizaron 3 anticuerpos monoclonales producidos con la cepa neumotrópica LA de BHV-1: Nr. 141 y 1240 fueron reactivos con cepas neumotrópicas y neurotrópicas de BHV-1; Nr. 131 no reacciona con cepas neurotrópicas. Se sembraron cultivos primarios de riñón de feto bovino sobre cubreobjetos e infectados con la cepa neumotrópica (LA) y la neurotrópica (A-663) de BHV-1. Terneros N^o 18, 19 y 20: muestras utilizadas como controles negativos. BHV-1 no fue aislado del cerebro de estos animales, pero sí de hígado o bazo.

IV.2.2. CARACTERIZACION VIRAL

Los resultados de inmunoperoxidasa del control y muestras BHV-1 positivas en los cuales se utilizo el ACM Nr. 1240 fueron idénticos a aquellos obtenidos con el ACM Nr. 141. Aunque pudo detectarse antígeno sobre células infectadas con la cepa neumotrópica LA con el método PAP, utilizando el ACM Nr. 131, no se observó tinción específica utilizando este ACM sobre células infectadas in vitro con la cepa neurotrópica A-663 ó en improntas de cerebro de los cuales se había aislado virus (fig. 11)

FIGURA 11. Impronta de cerebro de un ternero infectado con BHV-1. Se observa citoplasma de neuronas con tinción específica a través del método de inmunoperoxidasa, utilizando el ACM Nr. 141.



V. DISCUSION

A partir de la primavera de 1981 varias epizootias de encefalitis en terneros fueron reconocidas en la region central de Argentina (Schudel y col., 1983). De 131 epizootias registradas en un periodo de 8 años, herpesvirus bovino-1 (BVH-1), ha sido aislado utilizando métodos convencionales, a partir de muestras de cerebro de bovinos de 51 rebaños.

Dada la magnitud de la prevalencia y distribución de reactivos serológicos a BHV-1 y la variedad de cuadros clinicos a los que se encuentra asociado este virus, resultó necesario implementar un sistema eficiente para la caracterización y diagnóstico rapido del agente en cuestion. De este modo, utilizando herramientas biotecnológicas disponibles, fue posible ahondar en el conocimiento de la epidemiologia molecular de BHV-1 en la región. Estos datos serán útiles al tomar medidas profilácticas que contribuyan al control y eventual erradicación de esta enfermedad en nuestro medio.

El análisis y caracterización de aislamientos en nuestro medio permitió realizar un estudio de la epidemiologia molecular de BHV-1 en Argentina , y con el fin de ampliar el conocimiento sobre cepas circulantes, se incluyeron otras provenientes de Chile y Brasil.

Con respecto a los aislamientos obtenidos en Argentina, es marcado el incremento del número de muestra enviadas para aislamiento de BHV-1 durante el periodo analizado. Este hecho podria atribuirse a un mayor conocimiento y divulgación de la enfermedad, sin excluirse una mayor presentación de cuadros clinicos. Además debe tenerse en cuenta que el diagnóstico viral también es canalizado en otros organismos de control. Los datos evidencian mayor demanda de diagnósticos de laboratorio orientados al aislamiento e identificación de BHV-1 a partir de muestras provenientes de casos clinicos con sintomatologia nerviosa. En más del 50% de las muestras recibidas con diagnóstico presuntivo de BHV-1 se aisló el agente. Este hecho difiere llamativamente con la situación descrita en otros países, donde comunican la presentación de esta infección en forma muy esporádica con mayor incidencia de casos con signos respiratorios. En nuestro caso no podemos restar importancia a los otros cuadros clinicos de etiologia BHV-1 pues si bien el número de muestras recibidas con otros cuadros diferentes del nervioso podria atribuirse a que los cuadros

no son letales, pasando inadvertidos por la sospecha de otra etiología. Por otro lado, debe considerarse una menor eficiencia de aislamientos en esos casos por el momento de la toma y tipo de muestra ya que es difícil rescatar virus de hisopados, lavados prepuciales, y fetos que generalmente llegan en estado de autólisis avanzado. (Ruiz, 1989).

En base al análisis de reactividad con ciertos ACMs o SDS-PAGE de proteínas virales específicas, fue posible asignar aislamientos de BHV-1 a tipos virales definidos previamente (BHV-1.1/2 o BHV-1.3) (Metzler, 1985). La tinción con inmunoperoxidasa de células infectadas demostró ser un procedimiento confiable para una rápida caracterización de aislamientos de campo de BHV-1. Nuestros resultados indican que un panel de 3 ACMs es suficiente para este propósito. Cuando algunas cepas representativas fueron analizadas con ACMs adicionales el tipo viral fue confirmado. En esta investigación se observó una completa correlación entre los datos obtenidos por inmunoperoxidasa y SDS-PAGE.

La evaluación mediante inmunoperoxidasa con ACMs y SDS-PAGE, confirma reportes previos de nuestro laboratorio que indican que la mayoría de los aislamientos de BHV-1 obtenidos de cerebros de casos neurológicos presentan características BHV-1.3. Por otro lado, aislamientos caracterizados como BHV-1.3 fueron también recuperados a partir de 2 casos de aborto mostrando que, aparentemente, este tipo viral no solo se encuentra asociado enfermedad del sistema nervioso central (Schudel, 1986).

Todos los aislamientos genitales mostraron características BHV-1.1/2 cuando fueron caracterizados tanto con ACMs como con PAGE.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que BHV-1.1/2 y BHV-1.3 se encuentran en el Hemisferio Sur. En Argentina y Brasil todos los tipos de BHV-1 están presentes, y entre los pocos aislamientos chilenos analizados, ninguno tuvo características tipo BHV-1.3.

La identidad de un aislamiento de Brasil obtenido de un caso neurológico (BR-136) ha sido cuestionada por algunos autores (Studdert, 1990). Nuestros datos indican que este aislamiento pertenece al tipo BHV-1.3. Hemos demostrado que este aislamiento comparte epitopes con cepas australiana (N569) y argentinas aisladas de casos neurológicos, como se demostró por su

reactividad con ACMs Nr. 2915, 1624 y 2514, hecho que avala nuestra afirmación. Por otro lado, su perfil proteico es indistinguible de otros aislamientos argentinos (A-663, A-232, A-70, A-5). Sin embargo no podemos excluir la hipótesis mencionada por el mismo autor quien propone, tentativamente, que este aislamiento BR-136 y otros argentinos de igual origen, serían resultado de una recombinación y encuadrarían dentro de la designación herpesvirus encefalítico bovino (BEHV). Según Studdert, la historia natural de herpesvirus bovino encefalítico (BEHV) es enigmática. Aunque antigénica y genéticamente relacionado a BHV-1, BEHV parece ser distintivamente diferente en espacio y tiempo. Si, como BHV-1, es un alfa herpesvirus natural de bovino Europeo, luego tendría una historia natural inusual ya que esencialmente sólo ha sido identificado como una causa de encefalitis aunque en Argentina, donde han ocurrido más de 50 epizootias de encefalitis, aislamientos recuperados de fetos abortados respondieron al mismo tipo (Giavedoni y col., 1988). También se ha sugerido que BEHV puede no ser un herpesvirus natural de bovino europeo (*Bos taurus*), sino un herpesvirus natural de una especie de rumiante muy relacionada como Brahm/zebu (*Bos indicus*), el cual pudo haber sido transmitido al bovino europeo, produciendo en esta especie, una encefalitis fatal. No hay, sin embargo, evidencias que sustenten esta hipótesis. Otras explicaciones acerca del origen de BEHV indican que este virus representa una recombinante entre BHV-1 y uno o más herpesvirus de una especie rumiante relacionado o que es un producto de un rearrreglo genómico de BHV-1. Según Studdert, las diferencias entre BEHV y BHV-1 no son triviales. BEHV es una entidad genética, altamente conservada, aislada en diversas, aunque restringidas regiones geográficas, de epidemias de encefalitis altamente fatal.

Si bien el número de muestra estudiadas no permite un análisis estadístico, es interesante destacar que los resultados obtenidos revelan una clara asociación entre el tipo y signos clínicos, aunque este punto necesita de mayor cantidad de pruebas sólidas para ser demostrado. De manera general puede establecerse que todos los casos genitales respondieron al patrón BHV-1.1/2 y que aquellos que poseían características BHV-1.3 fueron aislados de bovinos con enfermedad neurológica caracterizada por encefalitis.

Su carácter neurotrópico, también ha sido demostrado experimentalmente. Con el propósito de establecer una correlación entre las características antigénicas y la actividad biológica de ciertas cepas, fue examinado el efecto de su inoculación en el conejo. Se tomó la cepa 5 de BHV-1 aislada en Buenos Aires, como representante de un aislamiento obtenido de un bovino que murió tras un cuadro encefalítico. Una vez caracterizada como BHV-1.3 se realizó la reproducción experimental en terneros. Posteriormente, se inocularon 10 conejos adultos con esta cepa (BHV-1.3) y LA como representante del tipo BHV-1.1 via conjuntival. Mientras la inoculación de la cepa respiratoria prototipo (LA) no cursa con un cuadro clínico, el aislamiento de origen encefálico aislado de un cuadro neurológico (cepa 5) produjo la muerte de 7 conejos entre los 9 y 18 d.p.i luego de la inoculación via conjuntival (Delhon y col., 1991). El virus fue aislado de cerebro y no de otros órganos, pudiéndose detectar antígeno viral por inmunoperoxidasa, utilizando un panel de ACMS (141, 60 y 2915) sobre improntas de cerebro, lo que permitió definirlo como perteneciente al tipo BHV-1.3 junto a otros aislamientos encefalitogénicos de BHV-1.

En este contexto debe mencionarse un experimento realizado por un grupo de la Universidad de Oklahoma, en el cual 7 de 8 aislamientos recuperados del sistema nervioso central de bovinos presentaron patrón de migración genómico indistinguible al de la cepa Cooper (BHV-1.1). Uno, sin embargo, difería de aquellos coincidiendo con los reportados para otras cepas neurotrópicas con características BHV-1 (australiana y argentina). Cuando este aislamiento fue inoculado en la córnea de conejos, al menos la mitad de los animales desarrollaron meningoencefalitis fatal con signos neurológicos 10-14 días luego de la inoculación. Conejos inoculados en la conjuntiva, con la misma dosis de la cepa Cooper, desarrollaron sólo una queratitis leve 3-4 días p.i. Esto indicaría que el sistema nervioso del bovino, puede ser infectado naturalmente con al menos dos diferentes tipos de BHV-1, y que al menos uno de estos es más neurovirulento que la cepa Cooper cuando inoculado ocularmente en conejos (d'Offay, 1989).

La técnica de inmunoperoxidasa ha sido utilizada para la detección de antígenos de herpesvirus en tejidos de animales experimentalmente infectados, principalmente el virus de la pseudorabia en improntas de cerebro y BHV-1 en secreciones nasales (Allan, 1985; Edwards, 1983). Estos

estudios indicaron que este método, sumado a sus ventajas operativas, posee un alto grado de especificidad y sensibilidad, comparado con el aislamiento viral. En un estudio preliminar se han reportado los resultados de un ensayo utilizando esta técnica para la detección de BHV-1 en muestras de cerebro con antisuero policlonal (Giavedoni y col., 1988). Se encontró que la misma presentaba una sensibilidad mayor que el aislamiento viral convencional e igual que la técnica de hibridación. No se obtuvieron resultados falsos positivos.

Uno de los objetivos del presente estudio fue examinar la eficiencia de la técnica de inmunoperoxidasa utilizando ACM como método diagnóstico para la detección de herpesvirus bovino-1 (BHV-1) comparada con la del método de aislamiento viral convencional. Se detectaron antígenos de BHV-1 sobre improntas de cerebro obtenidos de terneros de los cuales se había aislado virus por virología convencional. Esta técnica demostró ser altamente específica sin resultados falsos positivos observados tanto con el ACM Nr. 141 o el Nr. 1240, luego de un examen doble ciego.

De manera adicional fue posible realizar una caracterización rápida de los aislamientos utilizando 3 anticuerpos monoclonales reactivos con cepas neuro y/o neumotrópicas de BHV-1. Los resultados fueron consistentes con trabajos previos en los cuales se realizó una caracterización utilizando otras técnicas como inmunofluorescencia y ELISA.

Varios métodos rápidos de detección de antígenos incluyendo inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, ELISA y aglutinación reversa pasiva, han sido utilizados para la detección de BHV-1 en secreciones nasales (Edwards, 1983; 1987). Todos estos ensayos que utilizaban anticuerpos monoclonales resultaban menos sensibles que la metodología convencional de aislamiento viral por inoculación en cultivos de tejidos. En nuestro estudio, la comparación de resultados de aislamiento viral e inmunoperoxidasa indicaron que su sensibilidad es al menos similar. La detección de antígenos de BHV-1 en 3 cerebros de los cuales no fue aislado herpesvirus en cultivo de tejidos indicaron que la técnica de IPI puede ser aún más sensible que el método convencional. Esta posibilidad se encuentra sustentada por dos hechos: 1) Estas muestras fueron obtenidas de bovinos con signos de encefalitis viral y se obtuvo BHV-1 a partir de su hígado y

bazo y 2) Los resultados obtenidos luego del examen doble ciego con los anticuerpos monoclonales Nr. 141 y 1240 fueron idénticos. Resultados posteriores avalaron esta conclusión cuando se utilizó el test de hibridización con sondas radiactivas para detectar presencia de genomas de BHV-1 en esas muestras de cerebro.

Los aislamientos de herpesvirus recuperados de bovinos con meningoencefalitis en Argentina y Australia representarían hasta ahora una variante antigénica y genómica de BHV-1 no conocida previamente. Esto ha sido demostrado por análisis de polipeptidos y glicoproteínas virales, estudio del ADN viral con endonucleasas de restricción, y reactividad discriminatoria con anticuerpos monoclonales (Metzler, 1986). Los resultados de caracterización de BHV-1 sobre improntas, utilizando 3 ACMs, se correlacionaron con estudios en los cuales la reactividad de cepas neurotrópicas con ACMs Nrs. 141, 1240 y 131 fue ensayada por ELISA, inmunofluorescencia, e IP (Metzler, 1986, Friedly, 1987).

En base a los resultados obtenidos, pudo determinarse que la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando ACMs para diagnóstico rápido y caracterización preliminar de BHV-1 posee varias ventajas sobre los métodos convencionales: es altamente específica y probablemente tan sensible como aislamiento viral en cultivo de tejidos, es de fácil realización, y los resultados pueden ser obtenidos pocas horas después de la recepción de la muestra.

El estudio de la caracterización de nuevas variantes de BHV-1 de tipo 3, constituye el primer paso en el estudio de estos virus. Un paso posterior incluiría el mapeo genómico, por restricción enzimática para obtener información más completa acerca de este virus.

Este estudio constituye un aporte a un problema en el área de salud animal de creciente relevancia, esto es la aparición de encefalitis herpética bovina que afecta con mayor frecuencia a animales en condiciones de producción semíntensiva. El desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido permitiera el procesamiento de un gran número de muestras lo que redundaría en una mejor evaluación epidemiológica.

La caracterización de BHV-1 circulantes en nuestro medio es esencial para una correcta selección de antígenos vacunales. Finalmente las tecnologías utilizadas en este estudio podrían ser eventualmente transferidas a otras áreas de salud animal.

VI. CONCLUSIONES.

1. Ocho de nueve aislamientos de BHV-1 obtenidos de cerebros de casos neurologicos presentan características antigenicas BHV-1.3. Algunos de ellos confirmaron el tipo a través de su analisis por SDS-PAGE y un panel adicional de ACMs. Estos resultados permiten concluir que existe una fuerte asociación entre el tipo mencionado y potencial neurotrópico.
2. Todos los aislamientos genitales mostraron características BHV-1.1/2 en base tanto a su caracterización proteica como antigenica.
3. Los resultados obtenidos por análisis antigénico se correlacionaron totalmente con aquellos obtenidos a partir del perfil proteico.
4. Cuando el panel de ACMs utilizado para la caracterización antigénica se amplió se confirmó el tipo viral en todos los casos. Por ello, se deduce que seria suficiente un panel de 3 ACMs para identificar BHV-1 y ubicar un aislamiento dentro del tipo correspondiente.
5. La técnica de IPI constituye un método rápido de diagnóstico y caracterización de aislamientos de campo de BHV-1. Su sensibilidad es similar a la del aislamiento convencional.
6. En base a los resultados obtenidos hasta el momento, puede decirse que, BHV-1.3 representa un tipo diferente de BHV-1 y que, aparentemente coexiste en Argentina con BHV-1.1 y/o BHV-1/2. BHV-1.3 también está presente en Brasil. En Chile, sin embargo, no se han registrado hasta ahora. aislamientos con estas características.

VII. RESUMEN

El interés en el estudio de los herpesvirus bovino (BHV-1) se origina en su considerable importancia económica, difusión y capacidad para establecer infecciones latentes.

BHV-1 corresponde al grupo 1 de los 6 caracterizados en la familia Bovidae. La infección natural de bovinos con BHV-1 ha sido asociada con afecciones respiratorias (rinotraqueitis infecciosa), genitales (IPV y balanopostitis), del sistema nervioso central (meningoencefalitis), oculares, dérmicas, y entéricas.

A partir de 1981 varias epidemias de meningoencefalitis producidas por un herpesvirus (BHV-1) se registraron en la zona central de nuestro país. El laboratorio ha acumulado datos que indican la presencia de variantes genómicas y antigénicas. El estudio incluye el desarrollo de un método diagnóstico rápido y de alta especificidad y la caracterización antigénica y proteica de BHV-1 circulantes utilizando ACMs ya existentes y geles de poliacrilamida.

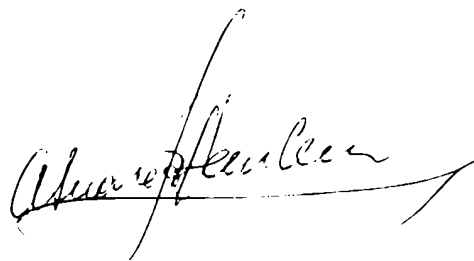
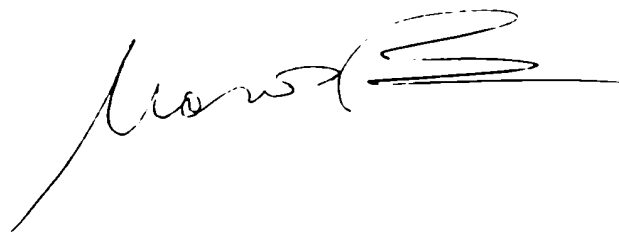
El estudio de caracterización antigénica y proteica de cepas de campo de BHV-1 circulantes en Argentina, Chile y Brasil se realizó con el propósito de obtener datos de la epidemiología molecular de BHV-1 en nuestro medio.

Se examinaron aislamientos efectuados entre 1982 y 1990 de casos de meningoencefalitis e infecciones genitales y respiratorias. La reactividad de los anticuerpos monoclonales (ACMs) con estos virus se determinó por inmunoperoxidasa indirecta (IPI) utilizando células infectadas *in vitro* como sustrato antigénico, y la caracterización proteica a través de SDS-PAGE.

Los datos obtenidos indicaron que la mayoría de los aislamientos obtenidos de casos neurológicos (8/9) mostraron características de BHV-1.3, mientras que todos los genitales poseían patrón BHV-1.1/2 y 3 mientras que en Chile el tipo 3 no parece tener importancia epidemiológica.

Por otro lado, empleando un panel de ACMs producidos con una cepa tipo 1 de herpes bovino-1 (BHV-1.1) se determinó que, cepas aisladas de casos locales de meningoencefalitis en terneros poseían características antigénicas diferentes a las de cepas prototipo aisladas de cuadros respiratorios.

Luego de desarrollada y optimizada la IPI demostró ser una técnica rápida, (3 hs.) útil en laboratorios sin acceso a cultivos celulares para el diagnóstico y caracterización rápida a partir de muestras de campo de BHV-1.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alfonso..." with a long horizontal stroke extending to the right.A handwritten signature in black ink, appearing to read "Mauricio..." with a long horizontal stroke extending to the right.

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMAN, M.; Peterhans, E.; Nyler, R. (1982) DNA of bovine Herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 43:36
- ACKERMAN, M.; Wyler, R. (1984) The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.*, 9:53
- AGUILAR-SETIEN, A.; Pastoret, P.P.; Schoenaers, F. (1980) L'immunité envers le virus de la rinotrachéite infectieuse bovine (bovid herpesvirus 1). *Ann. Méd. Vét.*, 124:103
- ALLAN, E.M.; Pirie, H.M.; Mosolla, P.M.; Selman, I.E. and Wiseman, A. (1980) The pathological features of severe cases of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Rec.*, 107:441
- ALLAN, G.M.; McNulty, M.D.; Todd, D. et al. (1985) The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microbiol.*, 10:481
- ARMSTRONG, J.A.; Pereira, H.G. and Andrews, C.H. (1961) Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity with the Herpesvirus group. *Virology*, 14:276
- BABIUK, L.A.; Rouse, B.T. (1976) Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *J. Gen. Virol.*, 31:221
- BABIUK, L.A.; Rouse, B.T. (1979) Immune control of herpesvirus latency. *Can. J. Microbiol.*, 25:267
- BABIUK, L.A.; L'Italien, J.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Zamb, T.; Lawman, N.P.; Hughes, G. and Gifford, G.A. (1987) Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 159:57
- BAKER, J.A.; McEntee, K.; Gillespie, M.H. (1960) Effects of infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (IBR-IPV) virus on newborn calves. *Cornell. Vet.*, 50:157
- BANKS, L.M.; Halliburton, I.W.; Purifoy, D.J.M.; Killington, R.A. and Powell, K.L. (1986) Studies on the herpes simplex virus alkaline nuclease: detection of type-common and type-specific epitopes on the enzyme. *J. Gen. Virol.*, 66:1

BAGUST, T.J. and Clarke, L. (1972) Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J.Comp.Path.*, 82:375

BARTHA, A.; Juhasz, M.; Liebermann, H. (1966) Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory diseases and keratoconjunctivitis. *Acta.Nat.Acad.Sci.Hyg.*, 16:357

BIELEFELDT OHMANN, H.; Gilchrist, J.E. and Babiuk, L. A. (1984) Effect of recombinant DNA-produced bovine interferon alpha (BoIfn-alpha) on the interaction between bovine alveolar macrophages and bovine herpesvirus type 1. *J.Gen.Virol.*, 65:1487

BIELEFELDT OHMANN, H. and Babiuk, L.A. (1985) Viral-bacterial pneumonia in calves effect of bovine herpesvirus-1 on immunologic functions. *J.Infect.Dis.*, 151:937

BINDRICH, H. (1960) Untersuchungen über das Virus des Blaschenausschlages des Rindes (Exanthema Coitale Vesiculosum Bovis). *Arch.Exp.Vet.Med.*, 14:656

BOLTON, D.C.; Chu, H-J.; Ardans, A.A.; Kelly, B.; Zee, Y.C. (1981) Evaluation of the critical parameters of a sensitive Elisa test using purified infectious bovine rhinotracheitis virus antigens. *J.Vet.Microbiol.*, 6:265

BOLTON, D.C.; Zee, Y.C. and Ardans, A.A. (1983) Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Vet.Microbiol.*, 8:57

BRAKE, F. and Studdert, M.J. (1985) Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust.Vet.J.*, 62:331

BWANGAMOI, O. and Kaminjolo, J.S. (1973) Observations on experimental infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in rabbits. *Bull.Epizoot.Dis.Afr.*, 21:357

CARRILLO, B.J.; Ambrogi, A.; Schudel, A.A.; Vasquez, M.; Dahme, E. and Pospichil, A. (1983) Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl.Vet.Med.*, B30:327

CARRILLO, B.J. ; Pospischil, A. and Dahme, E. (1983) Pathology of a bovine viral encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med.*, B30:161

CARMICHAEL, L.E. and Barnes, F.D. (1961) Proc. 65th Annual Meeting U.S. Livestock Sanit. Ass. p.384

CHASE, C.C.L.; Carter-Allen, K.; Lohff, C. and Letchworth ,G.J. (1990) Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1), herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *J. Virol.*, 64:4866

CHOW, T.L. and Davis, R.W. (1964) The susceptibility of mule deer to infectious bovine rhinotracheitis. *Amer. J. Vet. Res.*, 25:518

COLLINS, J.K.; Butcher, A.C.; Riegel, C.A.; McCrane, V.; Blair, C.D.; Teramoto, Y.A. and Winston, S. (1984) Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus-1. *J. Virol.*, 52:403

COLLINS, J.K.; Butcher, A.C. and Riegel, C.A. (1985) Immune response to bovine herpesvirus type 1 infections : virus-specific antibodies in sera from infected animals. *J. Clin. Microbiol.*, 21:546

DANNACHER, G.; Fedida, M.; Perrin, M.; Moussa, A.; Coudert, M. (1980) La rhinotracheite bovine infectieuse sa place dans la pathologie respiratoire. *Rev. Méd. Vet.*, 131:359

DARCEL C. Le Q. (1981) Comparison of constant and variable virus methods of measuring virus neutralizing antibodies to bovine herpesvirus-1. *J. Biol. Stand.*, 9:293

DARCEL C. Le Q. and Kozub, G.C. (1984) The effect of kaolin adsorption of serum on the virus neutralization and enzyme-linked immunosorbent assays of antibody to bovine herpesvirus-1. *J. Biol. Stand.*, 12:87

DE VILLERS, E.M. (1975) Purification of the IS-8 isolate of herpesvirus ovis (bovid herpesvirus-4) and some properties of its DNA. *J. Virol.*, 32:705

DELHON, G. (1990) Infecciones latentes por Herpesvirus neurotrópicos. *Adel. Microbiol. Enf. Infec.*, 8:11

DELHON, G.; Suarez Heinlein, A. (1991) Infección experimental en conejos y bovinos con un aislamiento encefalítico del herpesvirus bovino 1 (BHV-1). Manuscrito en preparación

DERBOSHIRE, J.B. and Caplan, B.A. (1976) The isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from stillbirth in swine. *Can.J.Comp.Med.*, 40:252

DHENNIN, L.; Gourreau, J.M.; Calvarin, R.; Kaiser, C. Le Corveller, M.; Perrin, G.; Woock, C. (1979) Une nouvelle forme clinique de rhinotrachéite infectieuse bovine. *Reel.Méd.Vet.*, 155:851

d'OFFAY, J.M., Fulton, R.W., Mock, R.E. (1990) Bovine herpesvirus-1 isolated from the CNS of cattle: genetic characterization and neurovirulent properties in rabbits. *Proceedings of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington* p.48

ENGEN, R.L.; Brown, T.T. (1991) Changes in phospholipids of alveolar lining material in calves after aerosol exposure to bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus. *Am.J.Vet.Res.*, 52:675

EDWARDS, S.; Chasey, D.; White, H. (1983) Experimental infectious bovine rhinotracheitis: Comparison of four antigen detection methods. *Res.Vet.Sci.*, 34:42

EDWARDS, S., Gitao, G.C. (1987) Highly antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. *Vet.Microbiol.*, 13:135

EDWARDS, S.; White, H. and Nixon, P. (1990) A study of the predominant genotypes of bovine herpesvirus-1 found in the U.K. *Vet. Microbiol.*, 22:213

EUGSTER, A.K.; Angulo, A. (1973) The use of micro-modified direct CF test in the detection of IBR and BDV antibodies. *Proc.Annu.Meet. U.S. Anim. Health Assoc.*, 77:615

EVERETT, R.D. (1987) The regulation of transcription of virus and cellular genes by Herpesvirus immediate-early gene products (review) *Anticancer Res.*, 6:57

FITZPATRICK, D.R.; Redmond, M.J.; Attah-Poku, S.K., van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Babiuk, L.A. and Zamb, T.J. (1990) Mapping epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIII *Virology*, 176:145

FITZPATRICK, D.R.; Zamb, T.J. and Babiuk, L.A. (1990) Expression of bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *J.Gen.Virol.*, 71:1215

FLAMMAND, A.; Wiktor, T.J.; Koprowski, H. (1980) Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabie-related virus protein II. *J.Gen.Virol.*, 48:105

FONDEVILA, N.A.; Lager, I.; Sadir, A.M.; Carrillo, B.J.; Villar, J.; Venzano, A.; Zurbriggen, M.; Gonzalez, D.; Ivancovich, J. y Schudel, A.A. (1981) Rinotraqueitis infecciosa bovina (HVB-1): Prevalencia de anticuerpos en rodeos bovinos del pais. *Rev. de Invest. Agropecuarias INTA*, 16:285

FORMAN, A.J. and Babiuk, L.A. (1982) Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function. *Infect.Immun.*, 35:1041

FULLER, A.O. and Spear, P.G. (1987) Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virio-cell fusion at the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 84:5454

GARDINER, M.R. and Nairn, M.E. (1964) Viral meningoencephalitis of calves in western Australia. *Aust.Vet.J.*, 40:225

GIAVEDONI, L. D.; Ruiz, M.; Fijtman, N.; Schudel, A.A. and Rodriguez, M. (1988) Rapid diagnosis of bovine herpesvirus encephalitis: Comparison of nuclei acid hybridization and immunoperoxidase methods using clinical samples. *J. Vet. Med.*, 35:280

GIBBS, E.P.J.; Rweyemamu, M.M. (1977) Bovine herpesviruses. Part. 1.-Bovine herpesvirus 1. *Vet.Bull.*, 47:327

GILBER, Y. y SAURAT, P. (1970) In 'Les maladies animales a virus' (eds. P. Lepine and P. Goret) L'Expansion Scientifique Francaise, p.17-71

GILLESPIE, J.H.; McEntee, K.; Kendrick, J.W.; Wagner, W.C. (1959) Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell. Vet.*, 49:288

GLORIOSO, J.; Schroder, C.H.; Kumel, G.; Szczesiul, M. and Levine, M. (1984) Immunogenicity of herpes simplex virus glycoproteins gC and gB and their role in protective immunity. *J.Virol.*, 50:805

GRIEBEL, P.J.; Qualtiere, L.; Davis, W.C.; Gee, A.; Bielefeldt Ohmann, H.; Lawman, M.J.P. and Babiuk, L.A. (1988) T-Lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus type-1 infection. *Viral Immunology*, 1:287

GRIEBEL, P.J.; Bielefeldt Ohmann, H.; Lawman, M.J.P. and Babiuk, L.A. (1990) The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T-lymphocytes. *J.Gen. Virol.*, 71:369

GUY, J.S.; Potgieter L.N.D. (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

HAHNEFELD, H.; Hahnefeld, E. (1964) Die Nukleinsäuren des Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis und des Blaschenausschlages des Rindes (Exanthema Coitale Vesiculosum Bovis. *Arch. Exp. Veterinaermed*, 18:921

HAMMERSCHMIDT, W.; Lurz, R.; Ludwig, H. and Buhk, H.J. (1990) Recombination of genomic terminus of bovine herpesvirus type 1 with cellular DNA. *J.Gen. Virol.*, 71:2043

HILL, B.D.; Hill, M.W.M.; Chung, Y.S. and Whittle, R.J. (1984) Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust. Vet. J.*, 61:242

HILL, T.J. (1987) Current eye research. *Special Lecture*, 6:1

HOMAN, E.J.; Easterday, B.C. (1980) Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am.J.Vet. Res.*, 41:1212

HUGHES, J.P.; Olander, J.H. and Wada, E.M. (1964) Keratoconjunctivitis associated with infection bovine rhinotracheitis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 145:32

HUGHES, G.; Babiuk, L.A. and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (1988) Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gIV. *Arch. Virol.*, 103:47

HUTCHINGS, D.; Campos, M.; Qualtiere, L.; and Babiuk, L.A. (1990) Inhibition of antigen-induced and interleukin-2-induced proliferation of bovine peripheral blood leukocytes by inactivated bovine herpesvirus-1. *J. Virol.*, 64:4146

HUTCHINGS, D.L.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. and Babiuk, L.A. (1990) Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus-1 proteins in immune cattle. *J. Virol.*, 64:5114

HUTYRA-MAREK (1910) *Lehrbuch der speziellen pathologie und therapie der haustiere*. 6ta ed. Gustav Fisher-Verlag. Jena, 1:354

ISRAEL, B.; Marshall, R.L. and Letchworth, G.J. III (1988) Epitope specificity and protective efficacy of the bovine immune response to bovine herpesvirus-1 glycoprotein vaccines. *Vaccine*, 6:349

JENSEN, R.; Griner, L.A.; Chow, T.L.; Brown, W.W. (1955) Infectious rhinotracheitis in feedlot cattle. I. Pathology and symptoms Proc. 59th Annual Meeting U.S. Livestock Sanit. Assoc. p.189-199

JOHNSON, R.T.; Mims, C.A. (1968) Pathogenesis of viral infections of the nervous system. *N. Engl. J. Med.*, 278:23

JOHNSTON, L.A.Y.; Simmons, G.C. and McGavin, M.D. (1962) A viral meningoencephalitis in calves. *Aust. Vet. J.*, 38:207

JONES, C.; Delhon, G.; Bratanich, A.; Kudtish, G. and Rock, D. (1990) Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 64:1164

KAHRS, R.F.; Smith, R.S. (1965) Infectious bovine rhinotracheitis. infectious pustular vulvovaginitis and abortion in a New York dairy herd. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 146:217

KAHRS, R.F.(1977) Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 171:1055

KAHRS, R.F.; Gibbs, E.P.J. and Larsen, R.F. (1980) The search for viruses in bovine semen. Review. *Theriogenology*, 14:151

KELLY, D.F. (1977) Experimental infection of rabbits with the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Br.J.Exp.Path.*, 58:168

KENDRICK, J.W.; Gillespie, J.H.; McEntee, K. (1958) Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell. Vet.*, 48:458

KENDRICK, J.W.; Straub, O.C. (1967) Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus infection in pregnant cows. *Am.J.Vet.Res.*, 28:1269

KENDRICK, J.W. (1973) In: *The Herpesviruses* (Ed. A.S.Kaplan) Academic Press. New York, London. p.427-493

KENDRICK, J.W. (1973) Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 163:852

KENNEDY, P.C.; Richards, W.P.C. (1964) The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Pathol.Vet.*, 1:7

KOKLES, R. (1967) Die Infektose Rhinotracheitis und das Coitalexanthem des Rindes In: *H.Rohrer Handbuch der Virusinfektion bei Tieren. BandII, Veb. Gustav Fischer Verlag. Jena, p. 901-960*

KUTISH, G.; Mainprize, T. and Rock, D. (1990) Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the Bovine Herpesvirus 1 genome. *J.Virol.*, 64:5730

LABZOFFSKY, N.A. (1974) *Virology Manual 2nd. Edn. Toronto: Ontario Ministry of Health, p.375*

LITTLE, S.P.; Jofre, J.T.; Courtney, R.J. and Schaffer, P.A. (1981) A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type-1. *Virology*, 115:149

LUDWIG, H.; Storz, J. (1973) Activation of herpesvirus from normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation. *Med. Microbiol. Immunol.*, 158:209

LUDWIG, H. (1983) Bovine herpesvirus In: *The Herpesviruses* Ed: B. Roizman Plenum Press. New York., 2:135

LUDWIG, H. (1984) Herpesviruses of bovidae: The characterization, grouping and role of different types, including latent viruses. In: Wittmann, G. Gaskell, R. M., Rziha, H. J. (eds.), *Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine*. Boston, p 171

LUDWIG, H. and Letchworth, G.J.III (1987) Temporal control of bovine herpesvirus-1 glycoprotein synthesis. *J. Virol.*, 61:3292

LUPTON, H.W.; Barnes, H.J. and Reed, D. E. (1980) Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell. Vet.*, 70:77

LUPTON, H.W. and Reed, D.E. (1980) Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.*, 41:283

MADIN, S.H.; York, C.J.; McKercher, D.G. (1956) Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*, 124:721

MARSHALL, R.L.; Israel, B.A. and Letchworth, G.J.III (1988) Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, 165:338

MARSHAL, R.L.; Rodriguez, L.L.; Letchworth, G.J.III (1986) Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.*, 57:745

MARTIN, S.; Courtney, R.J.; Fowler, G. and Rouse, B.T. (1988) Herpes simplex virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes recognize virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, 62:2265

MATTHEWS, R. E. F. (1982) Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 17:1

McCULLOUGH, K. C. (1986) Monoclonal antibodies: implications for virology. Brief review. *Arch. Virol.*, 87:1

McKERCHER, D. G.; Moulton, J. E.; Jasper, D. E. (1954) Virus and Virus-like cattle disease entities new to California. Proc. 58th Annual Meeting. U. S. Livestock Sanit. Assoc., p.226

McKERCHER, D. G.; Straub, O. C.; Saito, J. K.; Wada, E. M. (1959) Comparative studies of the etiological agents of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Can. J. Comp. Med.*, 23:320

McKERCHER, D. G. (1973) The viruses of other vertebrates In: Kaplan A. S. The Herpesviruses N. Y. Acad. Press., p. 427-493

METZLER, A. E.; Matile, H.; Gassman, 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-

METZLER, A. E.; Schudel, A. A. and Engels, M. (1986) Bovine herpesvirus-1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.*, 87:205

MILLER, J. M. (1955) Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 126:463

MILLER, J. M. and Van Der Maaten, M. J. (1987) Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Amer. J. Vet. Res.*, 48:1555

MILLER, J. M.; Whetstone, C. A.; Van Der Maaten, M. J. (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

MISRA, V.; Blumenthal, R. M. and Babiuk, L. A. (1981) Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.*, 40:367

MISRA, V.; Nelson, R. and Smith, M. (1988) Sequence of a bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for the glycoprotein g B. *Virology*, 166:542

MOHANTY, S.B.; Lillie, M.G., Corseilius, N.P. and Beck, J.D. (1972) Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis in goats. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 160:879

MOLELLO, J.A.; Chow, T.L., Owen, N.; Jensen, R. (1966) Placental pathology: V. Placental lesions of cattle experimentally infected with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 27:907

MOREIN, B. and Simons, K. (1985) Subunit vaccines against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes. *Vaccine*, 3:83

NARITA, M.; Inui, S.; Namba, K.; Shimizu, Y. (1976) Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Pathol.*, 86:93

NARITA, M.; Inui, S.; Namba, K.; Shimizu, Y. (1978) Neural changes in calves after intraconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Pathol.*, 88:381

NARITA, M.; Inui, S.; Namba, K.; Shimizu, Y. (1978) Neural changes in recurrent infection of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.*, 39:1399

NARITA, M.; Inui, S.; Murakami, Y.; Namba, K. and Shimizu, Y. (1982) Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Pathol.*, 92:41

NASH, A.A.; Jayasuriya, A.; Phelan, J.; Cobbold, S.P.; Waldmann, H. and Prospero, T. (1987) Different roles for L3T4 + and Lyt 2+ T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system. *J. Gen. Virol.*, 68:825

NETTLETON, P.F. AND Sharp, J.M. (1980) Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet. Rec.*, 107:379

NETTLETON, P.F.; Sharp, J.M., Herring, A.J., Herring, J.A. (1984) Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression, In: Wittmann, G., Gaskell, R.M., Rziha, H.J. (eds.), *Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine*. Boston, p. 191

NYAGA, P.N.; and McKercher, D.G. (1980) Pathogenesis of bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2:587

OKASAKI, K.; Honda, E.; Minetoma, T. and Kumagai, T. (1986) Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology*, 1:6:260

ONSTAD, O. and Saxegaard, F. (1967) Outbreaks of vaginitis and balanitis in swine. Clinical and pathological findings. *Nord. Vet. Med.*, 19:49

OWEN, N.V.; Chow, T.L.; Molello, J.A. (1968) Infectious bovine rhinotracheitis: relationship of level of maternal antibody titer to incidence of fetal death and abortion. *Am. J. Vet. Res.*, 29:1967

OWEN, N.V.; Chow, T.L.; Molello, J.A. (1964) bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 25:1617

PASTORET, P.P.; Aguilar-Setién, A.; Burtonboy, G., Schoenaers, F., (1978) Mesure de la réexcretion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine après injection de dexaméthasone. *Ann. Med. Vét.*, 122:449

PASTORET, P.P.; Burtonboy, G.; Aguilar-Setién, A.; Shoenaers, F. (1978) Mesure de l'excretion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine après inoculation expérimentale. *Ann. Méd. Vét.*, 122:441

PASTORET, P.P., Babiuk, L.A.; Misra, V. and Griebel, P. (1980) Reactivation of temperature-sensitive and non temperature sensitive infectious bovine rhinotracheitis virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, 29:483

- PASTORET, P.P.; Burtonboy, G; Aguilar- Setién A.; Godart, M.; Lamy, M.E.; Schoenaers F. (1980) Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovid herpesvirus-1) from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.*, 5:187
- PASTORET, P.P.; Thiry, E.; Brochier, B. and Derboven, G. (1982) Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency consequences of latency. *Ann.Rech.Vét.*, 13:221
- PETER, C.P.; Gratzek, J.B. and Ramsey, F.K. (1966) Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: pathogenesis studies by fluorescent antibody tracing. *Amer.J.Vet.Res.*, 27:1583
- PLOWRIGHT, W.; Masdon, R.F.; Armstrong, J.A. (1965) Growth and characterization of the virus of bovine malignant catarrhal fever in East Africa. *J.Gen.Microbiol.*, 39:253
- RAUH, I.; Weiland, F.; Fehler, F.; Keil, G.M.; Mettenleiter, T. (1991) Pseudorabies virus mutants lacking the essential glycoprotein gII can be complemented by glycoprotein gI of bovine herpesvirus 1. *J.Virol.*, 65:621
- REDDEHASE, M.J.; Mutter, W.; Munca, K.; Buhning, H.J. and Koszinowski, U.H. (1987) CD-8 positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J.Virol.*, 61:3102
- RODAK, L.; Pospisil, Z. and Hampl, J. (1983) A study of the dynamics of the production of class-specific antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in calves using a solid-phase radioimmunoassay. *Zbl. Vet. Med.B.*, 30:708
- ROIZMAN, B.; Bartha, A.; Biggs, P.M.; Carmichael, L.E.; Granoff, A.; Hampar, B.; Kaplan, A.S.; Melendez, L.U.; Munk K.; Nahimias A.; Plummer, G.; Rajcani, J.; Rapp, F.; Terni, M.; Dethe, G.; Watson, D.H.; Wildy, P. (1973) Provisional labels for herpesviruses. *J.Gen.Virol.*, 20:417
- ROIZMAN, B.; Furlong, D. (1974) The replication of herpesviruses In: *Comprehensive Virology*, Eds: H. Fraenkel-Conrat y R.R. Wagner. Plenum Press. New York, vol.3 chapter 4 , p.229-402

ROIZMAN, B. (1982) The family Herpesviridae. General description, taxonomy and classification In: The viruses. Herpesviruses. Edited by B. Roizman, Plenum Press, New York, vol. 1, p. 1-23

ROIZMAN, B. and Batterson, W. (1985) Herpesviruses and their replication In: B.N. Fields; D.M. Knipe; R.M. Chanock; J. Melnick; B. Roizman and R. Shope (ed), Virology. Raven Press. Inc., New York, p. 497-526

ROIZMAN, B. and Sears, A.E. (1987) An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann.Rev.Microbiol.*, 41:543

ROSSI, C.R. and Kiesel, G.K. (1977) Susceptibility of bovine macrophage and tracheal-ring cultures to bovine viruses. *Am.J.Vet.Res.*, 38:1705

ROUSE, B.T. and Babiuk, L.A. (1978) Mechanisms of recovery from herpesvirus infection. A review. *Can.J.Comp.Med.*, 42:414

RUIZ, M.L.; Lager, I.A.; Cornaglia, E.; Barrandeguy M.; Zabal, O.; Bolondi, A.; Uroz, J.C. (1989) Diagnóstico de virosis bovinas durante el periodo 1981-1985. *Rev.Med.Vet.*, 70:190

RWEYEMAMU, M.M.; Johnson, R.H. (1969) A serological comparison of seven strains of bovine herpes mammillitis virus. *Res.Vet.Science*, 10:102

RWEYEMAMU, M.M. and Loretu, K. (1973) Isolation of non-syncytia forming herpes viruses from cattle in Tanzania. *J.Comp.Path.*, 83:377

SARMIENTO, M.; Haffey, M. and Spear, P.G. (1979) Membrane proteins specified by herpes simplex virus III. Role of glycoprotein vp7 (B2) in virion infectivity. *J.Virol.*, 29:1149

SCHMIDD, D.S. (1988) The human MHC- restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD+, CD8-T cells and is restricted to the DR region of the MHC complex. *J.Immunol.*, 140:3610

SCHROEDER, E.L.; Easterday, B.C. (1968) Studies on the pathogenesis of infectious bovine rhinotracheitis following aerosol exposure. *Cornell.Vet.*, 58:442

SCHROEDER, R.J., Moys, M.D. (1954) An acute respiratory infection of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 125:471

SKARE, J.; Summers, W.P.; Summers W.C. (1975) Structure and function of herpesvirus genomes I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with Eco RI restriction endonuclease. *J. Virol.*, 15:726

SMITH, P.C. (1978) Experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infections of english ferrets (*Mustela putorius furo*) *Am. J. Vet. Res.*, 39:1369

SOLSONA, M.; Perrin, B.; Perrin, M.; Moussa, A. (1980) Recherche des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse par la méthode Elisa. *Bull. Acad. Vét. de France*, 53:215

SPLITTER, G.A. and Eskra (1986) Bovine T lymphocyte response to bovine herpesvirus-1 cell phenotypes, viral recognition and acid-labile interferon production. *Veterinary immunology and immunopathology*, 11:235

SRIKUMARAN, S.; Onisk, D.V., Borca, M.V.; Nataraj, C. and Zamb, T.J. (1990) Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to bovine herpesvirus-1. *Immunology*, 70:284

STEVENS, J.G., Groman, N.B. (1964) Infectious bovine rhinotracheitis replication, cytopathology, and plaque formation in the presence and absence of nuclei acid analogues. *J. Bacteriol.*, 87:446

STRAUB, O.C. (1978) Bovine Herpesvirus Infektionen. Veb. Band 17. Gustav Fisher Verlag. Jena

STUBBINGS, D.P., Cameron, I.R.D. (1981) Bovine abortion associated with infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Vet. Rec.*, 108:101

STUDDERT, M.J. (1990) Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.*, 126:21

TIKOO, S.K.; Fitzpatrick D.R.; Babiuk L.A. and Zamb T.J. (1990) Molecular cloning, sequencing and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.*, 64: 5132

TRUDEL, M.; Nadon, F.; Seguin, C.; Boulay, G. and Lussier, G. (1987) Vaccination of rabbits with a bovine herpesvirus type 1 subunit vaccine: adjuvant effect of ISCOM'S. *Vaccine*, 5:239

TREPANIER, P.; Minocha, H.C.; Bastien, Y. Nadon, F.; Seguin, C.; Lussier, G. and Trudel, M. (1986) Bovine herpesvirus-1: strain comparison of polypeptides and identification of a neutralizing epitope on the 90-kD hemagglutinin. *J. Virol.* , 60:302

VANDER MAATEN, M.J.; Miller, J.M. and Whetstone, C.A. (1985) Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding. *Amer. J. Vet. Res.* , 46:1996

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S.; van den Hurk, J.V., Gilchrist, J.E.; Misra, V. and Babiuk, L. A. (1984) Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology*, 135:466

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S. and Babiuk, L. A. (1985) Antigenic and immunogenic characteristics of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins gvp 3/9 and gvp6/11a/16, purified by immunoabsorbent chromatography. *Virology*, 144:204

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S. and Babiuk L. A. (1986) Polypeptide specificity of the antibody response after primary and recurrent infection with bovine herpesvirus-1. *J. Clin. Microbiol.* , 23:274

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S.; Zamb, T. and Babiuk, L.A. (1989) Synthesis, cellular location, and immunogenicity of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* , 63:2159

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S; Hughes, G. and Babiuk, L.A. (1990) The role of carbohydrate in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIV. *J. Gen. Virol.* , 71:2053

VESTERGAARD, B.F. and Norrild, B. (1979) Crossed immunoelectrophoretic analysis and viral neutralizing activity of five monospecific antisera against five different herpes simplex virus glycoproteins. *International Agency Research Cancer Science Publications*, 24:225

WATT, J.A.; Johnston, W.S.; Nacleod, N.S. and Borlow, R.M. (1981) Infectious bovine rhinotracheitis encephalitis. *Vet.Rec.*, 108: 63

WAGNER, W.C.; Gillespie, J.H. (1959) Comparative studies of a canadian strain with New York strain of infectious pustular vulvovaginitis virus and with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell. Vet.*, 49:409

WEBSTER, R.G. Kendal, A.P., Gerhark, W. (1979) Analysis of antigenic drift in recently isolated influenza A (H1N1) viruses using monoclonal antibody preparations. *Virology*, 96: 258

WEIBLEN, R. (1989) Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. *Vet.Rec.*, 124:666

WEIBLEN, R., Kreutz, L.C., Canabarro, T.F. and Flores, I.E. (1991) Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. *Braz.J.Med. Biol.Res.*, 24:773

WELLEMANS, G. and Leunen, J. (1974) Le tropisme digestif du virus IBR. II examenes sérologiques. *Ann.Méd.Vet.*, 118:243

WELLEMANS, G. (1975) La rhinotracheite infectieuse (IBR) in Belgique. *Bull.Off.Int.Epiz.*, 84:9

WHESTONE, C.A.; Wheeler, J.G. and Reed, D.E. (1986) Investigation of possible vaccine induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis, using restriction enconuclease analysis of viral DNA. *Am.J.Vet.Res.*, 47:1789

WIKTOR, T.J. and Koprowski, H. (1978) Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75:3938

WIKTOR, T.J. and Koprowski, H. (1980) Antigenic variants of rabies virus. *J.Exp.Med.*, 152:99

WIRTH, U.V.; Gunkel, K.; Engels, M. and Schwyzer M. (1989) Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J.Virol.*, 63:4882

WYLER, R.; Engels, M. and Schwyzer, M. (1987) Infectious bovine rhinotracheitis vulvovaginitis (BHV-1) In: "Herpesvirussess diseases of cattle, horses adn pigs" *Developments in veterinary virology*. ed. G. Wittman, Kluwer Academic Publishers Boston Press, p.1-72

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

YORK, C.J.; Schwarz, A.J.F. and Estela L. A. (1957) The isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture. *Proc.Soc. Exp. Biol.Med.* , 94:740

ZAMB, T.J. (1987) Identification of genes encoding the major immunogens of BHV-1: the mapping, subcloning, and expression in foreign systems of the gB, gC and gD gene homologs. 68th Annual Meeting of the conference of Research Works in Animal Diseases, Chicago, III, 16-17 Nov. 1987

ZUFFA, A.; Chumchal, R.; Grunert Z. (1976) Mikroepidemiologie und Mikroplaquetitration des Virus des Infectiosen Rhinotracheitis des Rindes auf Primare Kabermieren-Zellen Mittels Immunofluoreszenz. *Arch. Exp. Vet. Med.* , 30:441