

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata.

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/OTROS TEMAS: Virología Molecular.

TÍTULO DEL TRABAJO: **ESTUDIOS VIROLÓGICOS Y MOLECULARES EN HERPESVIRUS EQUINO 1 AISLADOS EN ARGENTINA.**

AUTOR(ES): NA Fuentealba, GP Martín Ocampos, GH Sguazza, MA Tizzano, ET Gonzalez, SG Corva², CG Barbeito, MRI Pecoraro, CM Galosi.

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: nadiafuentealba@fcv.unlp.edu.ar;
gisellem@fcv.unlp.edu.ar; sguazza@fcv.unlp.edu.ar; mtizzano@fcv.unlp.edu.ar;
etgonzal@fcv.unlp.edu.ar; sgcorva@fcv.unlp.edu.ar; barbeito@fcv.unlp.edu.ar;
peco@fcv.unlp.edu.ar; cmgalosi@fcv.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES: Herpesvirus equino 1, Estudios virológicos, Estudios moleculares
Herpesvirus equino 1, estudios virológicos estudios moleculares

INTRODUCCION

El herpesvirus equino 1 (EHV-1) es un patógeno que afecta a los miembros de la familia *Equidae* y se encuentra distribuido mundialmente. Fue descrito por primera vez en Estados Unidos en la década del 30 (6) y a pesar de que hace más de 70 años desde su aislamiento y de continuos ensayos de diferentes vacunas para su control, aún sigue siendo el mayor causante de pérdidas económicas en la producción equina. (20) La infección, con este virus, se manifiesta con sintomatología respiratoria y nerviosa, abortos y síndrome neonatal que generalmente lleva a la muerte del potrillo en las primeras 48 horas de vida. La pérdida del potrillo ocasiona importantes bajas en los establecimientos de cría equina. Se considera que el EHV-1 es el principal agente viral causante de abortos que, luego de un período de incubación variable, ocurren generalmente en el último tercio de la preñez sin signos patognomónicos previos. A pesar de que la infección primaria genera una respuesta inmune humoral y la producción de anticuerpos (Ac) con capacidad neutralizante, los animales no desarrollan inmunidad duradera contra el EHV-1 siendo susceptibles a la reinfección. Como todos los herpesvirus el EHV-1 también produce infecciones latentes que involucra a linfocitos y ganglio trigémino. Ante determinadas situaciones de estrés, el virus latente se reactiva, con o sin sintomatología manifiesta. En los animales de mas edad los signos respiratorios posteriores a la reexcreción viral resultan inadvertidos, sin embargo sucede eliminación de virus y viremia asociada a células por lo que posteriormente las hembras pueden abortar (1, 2, 4). Para la profilaxis en el mundo existen vacunas inactivadas, atenuadas y elaboradas por ingeniería genética, pero todas requieren repeticiones de inmunización y no previenen ni la viremia asociada a células ni el aborto. La eficacia de las vacunas disponibles para prevenir la infección o la reactivación de virus latentes aún es cuestionada (23) Es por eso que las investigaciones que se realizan mundialmente sobre el EHV-1 se encuentran dirigidas aún a tres aspectos principales: a) esclarecer la patogenia del aborto y del fenómeno de latencia y reactivación viral (20) (b) relacionar la estructura molecular de las cepas virales con la virulencia y antigenicidad (19) c) obtener inmunógenos que desencadene respuesta inmune que prevenga el aborto (23)

OBJETIVO

Con este trabajo se pretende difundir los estudios que se realizan en la República Argentina desde que se aisló por primera vez el EHV-1 con el objeto de contribuir al esclarecimiento de los aspectos relacionados a la patogenicidad e inmunogenicidad utilizando técnicas básicas en estudios virológicos y las nuevas técnicas de biología molecular.

METODOLOGÍA - RESULTADOS

Análisis serológicos

La primera detección de anticuerpos (Ac) se realizó por la técnica de fijación de complemento, en el año 1965 (5) y en 1978 se determinó la existencia de 25% de reactores. En 1984 se confirmaron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa por la técnica de virusneutralización (VN) (25). En 1985 se elaboró un antígeno para detección de anticuerpos por la técnica de inmunodifusión (24) y en 1989 se estandarizó la técnica de hemólisis radial simple como técnica de diagnóstico serológico alternativa (9). En 1993 se desarrolló una técnica de ELISA indirecto utilizando un antígeno soluble elaborado con una cepa viral autóctona. (11). El último relevamiento serológico realizado en Argentina por la técnica de VN en el año 2003 demostró la existencia de 80 % de reactores.

Aislamientos virales

En 1979 se realizó el primer aislamiento viral (AV) a partir de un feto equino abortado. (7). En 1985 fue aislada una cepa a partir de plasma rico en leucocitos de un animal que presentó signos respiratorios (10). A partir de ese momento se realizaron numerosos aislamientos a partir de fetos abortados o neonatos muertos. Para el AV a partir de muestras problema se procedió de acuerdo a los métodos convencionales: los órganos se procesaron como homogenatos al 10% en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y posteriormente fueron centrifugados a 6000 rpm durante 20 min. Los hisopados de animales con signos respiratorios fueron extraídos en forma aséptica, mantenidos en MEM-2%SFB y centrifugados a 6000 rpm durante 20 min. Las muestras de sangre tomadas de animales con signos respiratorios se dejaron en reposo por 1 h a 4°C y una vez observada la separación de la fracción de glóbulos rojos, el plasma rico en leucocitos fue separado y congelado y descongelado tres veces para favorecer la liberación de las partículas virales. Los sobrenadantes obtenidos del procesamiento de los órganos, hisopos y el plasma rico en leucocitos se conservaron a -70°C hasta su inoculación en diluciones en base 10 sobre monocapas confluentes de células RK13 (Riñón de conejo) y cultivos primarios de riñón de feto equino. Cada una de las muestras fue pasada tres veces sobre los cultivos celulares antes de considerarlas negativas. Una vez comprobada la aparición de efecto citopatogénico (ECP) los aislamientos virales fueron confirmados por VN con suero positivo control de referencia o por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos.

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se trabajó con muestras de órganos de fetos abortados o neonatos en diferente estado de conservación. Se ensayaron diferentes métodos de extracción del ADN, se analizaron

diferentes pares de cebadores que amplifican fragmentos genómicos de las principales glicoproteínas (gp) y se estandarizó el sistema de amplificación para cada caso. La especificidad de la reacción fue determinada por la digestión con endonucleasas de restricción (ER). El sistema de extracción de ADN para PCR en donde se combinó el tratamiento con Proteinasa K y solución sobresaturada de CINa resultó útil para todo tipo de muestras en circunstancias en las cuales el agente causal no pudo ser aislado usando la convencional técnica de AV debido al estado autolítico de las mismas. Con el par de cebadores que amplificó un segmento genómico correspondiente a la gpC se obtuvo un fragmento de 489 pares de base (pb). La especificidad determinada con XhoI permitió obtener dos fragmentos de 287 y 202 pb. (Figura 1) La técnica desarrollada significó un importante avance en Argentina en donde las distancias recorridas por las muestras son muy largas hasta llegar al laboratorio de diagnóstico. (1er Premio Asociación Argentina Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 2000) (12)

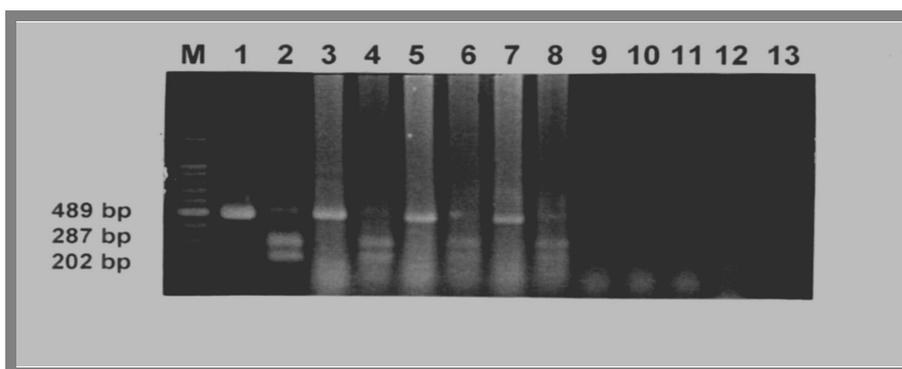


Figura 1: M: marcador de PM (100pKb). 1: ADN control positivo. 3, 5 y 7: amplificación positiva a partir de bazo, hígado y pulmón en mal estado de conservación. 2, 4, 6 y 8: productos de PCR digeridos con XhoI. 9, 10, 11 y 12: ADN controles negativos (EHV-4, EHV-2, BHV-1, SHV-1). 13: control negativo: agua destilada

Estudios de patogenicidad en modelos experimentales

El modelo Balb/C establecido en la década del 90 por Awan y col. (3) es útil para estudiar la virulencia de cepas de EHV-1 y para investigar y evaluar el potencial de las vacunas contra este virus. Es por eso que en el año 1997 y debido a las diferencias de comportamiento que algunas cepas presentaban sobre cultivos celulares, principalmente el primer aislamiento argentino de EHV-1 (cepa SP), dichas cepas se analizaron de acuerdo a su comportamiento patogénico en el modelo ratón Balb/C. Todos los estudios se realizaron comparativamente con cepas internacionales de referencia.

Estudios en ratones Balb/C lactantes: las cepas en estudio fueron inoculadas intracerebralmente en ratones y de acuerdo a su capacidad de producir síntomas en los animales, a su probabilidad de reisolamiento y a su potencial neuropatógeno se clasificaron en diferentes biotipos. (13)

Estudios en ratones Balb/C modelo respiratorio y abortigénico: La cepa SP fue inoculada por vía intranasal en ratones de 3-4 semanas de edad y en hembras preñadas en diferentes tercios de la gestación. Se evaluaron los signos respiratorios, la recuperación de virus de pulmón de los animales infectados, la capacidad de producir viremia, las variaciones de peso corporal en las hembras gestantes, las lesiones histológicas en diferentes órganos y la producción de abortos, reabsorciones y/o trastornos de la preñez. Tanto en el modelo respiratorio como abortigénico la cepa SP demostró ser de menor virulencia, no produjo signos abortigénicos ni cambios histológicos en placentas y fetos y protegió a ratones previamente inmunizados contra la descarga de una cepa virulenta. (15, 17). Utilizando el mismo modelo experimental se analizaron otras 5 cepas observándose que en una de ellas (8/90) se produjeron lesiones más severas a nivel de útero de ratonas infectadas experimentalmente (21).

Estudios moleculares

Paralelamente a los estudios de patogenicidad se iniciaron los estudios moleculares de las cepas de herpesvirus aisladas hasta el momento para relacionar su diferente comportamiento cultural en cultivos celulares y virulencia en los modelos experimentales con su estructura genómica.

Determinación de los patrones de restricción (RP) de ADN

En el año 1997 se analizaron los electroferotipos de 10 cepas aisladas entre 1979 y 1991. Se infectaron células RK13 con cada una de las cepas y cuando el ECP fue del 80% las células se levantaron, se lavaron y se trataron con Proteinasa K. El ADN total fue extraído con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, precipitado con alcohol absoluto y posteriormente digerido con las enzimas de restricción (ER) *Bam*HI y *Bgl*II. Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 0,5% a 20V durante 16 hs en buffer TAE (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH8.0). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV luego de la tinción con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron homogeneidad genética de las cepas aunque la cepa SP, el primer aislamiento autóctono pudo ser diferenciado de las cepas restantes por la pérdida del fragmento *Bam*HI"e" y la diferente movilidad del grupo de fragmentos *Bam*HI"h-i-j-k" (14).

En el año 2005 se analizaron 60 cepas recuperadas de diferentes regiones del país a partir de fetos abortados y 8 cepas de neonatos muertos. Cada una de las muestras fue procesada de acuerdo a la metodología citada previamente. Para el estudio de los RP se utilizaron las ER *Bam*HI, *Kpn*I y *Bgl*II. En este trabajo, dos cepas denominadas 1/96 y 3/01 fueron tipificadas con *Bam*HI como genoma 1B mientras que las restantes demostraron

posar genoma 1P, BglII permitió diferenciar como EHV-11B a la cepa 3/01 y KpnI no permitió diferenciación alguna. (Figura 2).

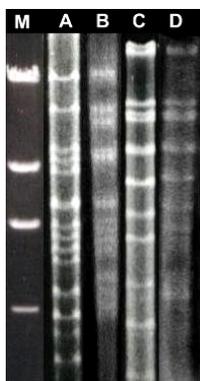


Figura 2: M: λ Lambda *Hind*III (23.1, 9.4, 6.7, 4.4 kb), A: *Bam*HI 1P, B: *Bam*HI cepa 3/01 (EHV-1 1B) C: *Bgl*II 1B , D: *Bgl*II cepa 3/01 (EHV-1 1B)

Estos resultados demostraron que el genoma EHV-1 1B esta presente en la Argentina desde 1996 documentándose por primera vez la heterogeneidad genómica de las cepas. Este trabajo constituyó el primer estudio en donde se analizaron todas las cepas de EHV-1 aisladas en Argentina en los últimos 25 años (22).

Estudios moleculares del gen codificante de la gC de la cepa argentina SP

El fragmento *Bam*HI“h” de EHV-1 contiene el gen que codifica para la gpC que es responsable de la interacción primaria entre el virión y la superficie celular contribuyendo a la penetración en la célula blanco. Es además indispensable para la multiplicación del virus en cultivos celulares y contribuye a la virulencia y patogenicidad.. Estudios previos citados demostraron particularidades genómicas y de virulencia de la cepa (15, 17) por lo que en este trabajo se estudió una porción del gen que codifica para la gpC, comparativamente con la cepa japonesa HH1 y con el aislamiento argentino IR/01. Se amplificó por PCR la porción genómica en estudio, se purificaron los fragmentos obtenidos y se secuenciaron en el instituto BRC (Biotechnology Resource Center), Universidad Cornell (Ithaca – New York). El análisis se realizó comparando además los resultados con la cepa Ab4 totalmente secuenciada y disponible en el "Gene Bank". La cepa SP no demostró la presencia de inserciones ni deleciones, solo se registró una mutación silenciosa de una C por una A en la posición 4397 del fragmento *Bam*HI“h”. (Figura 3). Los resultados expuestos permiten inferir que la región de la gpC estudiada de la cepa SP no estaría involucrada en la menor virulencia demostrada en el ratón BALB/C . El comportamiento observado podría deberse entonces a la particularidad de esta cepa en el fragmento *Bam*HI “e” que involucra a los genes 61-64 o a la región intergénica (8).

| | | 4397 | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| SP | (212) | TGT | ACG | GCT | AAA | TGC | GTG | CCG | AGC | ACC | GGG | GTG | TTC | GTA | (173) |
| | | Cys | Thr | Ala | Lys | Cys | Val | Pro | Ser | Thr | Gly | Val | Phe | Val | |
| HH1 | (212) | TGT | ACG | GCT | AAA | TGC | GTA | CCG | AGC | ACC | GGG | GTG | TTC | GTA | (173) |
| | | Cys | Thr | Ala | Lys | Cys | Val | Pro | Ser | Thr | Gly | Val | Phe | Val | |
| IR | (212) | TGT | ACG | GCT | AAA | TGC | GTA | CCG | AGC | ACC | GGG | GTG | TTC | GTA | (173) |
| | | Cys | Thr | Ala | Lys | Cys | Val | Pro | Ser | Thr | Gly | Val | Phe | Val | |
| Ab4 BamHI h | (4415) | TGT | ACG | GCT | AAA | TGC | GTA | CCG | AGC | ACC | GGG | GTG | TTC | GTA | (4376) |
| | | Cys | Thr | Ala | Lys | Cys | Val | Pro | Ser | Thr | Gly | Val | Phe | Val | |
| Consensus | | TGT | ACG | GCT | AAA | TGC | GTA | CCG | AGC | ACC | GGG | GTG | TTC | GTA | |

Figura 3: Análisis genómico comparativo de dos cepas argentinas de EHV-1 (SP e IR) con dos cepas de referencia (HH1 y AB4)

Estudios moleculares de la región intergénica

La región intergénica (RI) ubicada entre el ORF 62 y 63, posee un tamaño aproximado de 1.5 kbp. Estudios previos (18), demostraron que esta región estaría involucrada en la virulencia y el crecimiento viral *in vitro*. Posee 4 dominios: dos conservados ubicados entre las posiciones 108803-108945 y 109551-110286 y dos variables entre las posiciones 108946-109550 y 110287-110385. En este trabajo se amplificó por PCR con dos pares de cebadores específicos la porción genómica comprendida entre las posiciones 108486 y 109734, que involucra al ORF 62, que codifica a la gpL y a los dos primeros dominios de la región intergénica. Se analizaron 21 cepas aisladas de distintas regiones geográficas de Argentina y las cepas de referencia HH1 (Japón) y KyB (EEUU). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados de acuerdo a la metodología descrita previamente. Los resultados indicaron que la porción genómica analizada presenta un alto grado de conservación. No se detectaron mutaciones determinándose que la proteína gL no presenta variaciones entre las cepas estudiadas (16). La porción genómica correspondiente a los dos primeros dominios de la RI también presentó un alto grado de conservación aunque se encontraron inserciones de 18 bp en distintas posiciones (108942 y 109022). La posición 108942 presenta inserciones de 18 bp en trece de las cepas estudiadas mientras que en la posición 109022 la cepa de referencia HH1, AR12 y AR13 no presentaron estas inserciones. Estos resultados permiten inferir que esta región tampoco estaría involucrada en la virulencia de las cepas incluidas en este estudio sobre todo en aquellas que presentaron diferencias de patogenicidad en el modelo ratón.

CONCLUSIONES

Los resultados hallados en 27 años de estudios en Herpesvirus equino 1 en Argentina permiten concluir que:

- 1- el EHV-1 es enzoótico en el país.
- 2- desde el año 1996 existe en el país el genoma tipo 1B que hasta esa fecha no había sido detectado.
- 3- Los estudios de patogenicidad en el modelo experimental ratón Balb/C determinan que algunas cepas presentan diferente virulencia.
- 4- La primera cepa argentina aislada es de baja virulencia y protege contra una descarga con una cepa patogénica.
- 5- Las regiones genómicas analizadas hasta el momento no serían las responsable de las variaciones de virulencia observadas entre algunas cepas.
- 6- Son necesarios mayores estudios genómicos para caracterizar las cepas.
- 7- Es necesario continuar con el estudio de este virus dirigiendo las investigaciones a la producción de inmunógenos utilizando técnicas de biología molecular

REFERENCIAS

1. Allen GP, Bryans JT. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Pandey, R. (Ed), Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, vol.2, S. Karger, Basel, pp. 78-144. 1986.
2. Allen GP, Kidd JH, Slater JD, Smith KC. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. Proc. 8th Int. Conf. Eq. Inf. Dis. Eds: U Wernery, JF Wade JA, Mumford, Kaaden OR. R&W Pub (Newmarket) pp 129-146. 1999.
3. Awan AR, Chong YC, Field HJ. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. J. Gen. Virol. 71, 1131-1140. 1990.
4. Crabb BS, Studdert MJ. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). Adv.Virus.Res. 45: 153-190. 1995.
5. De Diego AI. Guia para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (aves y mamíferos). Ed.del autor, Bs As, Argentina, pp: 587. 1974.
6. Dimock WW, Edwards PR. Is there a filterable virus of abortion in mares? Ky. Agr. Exp. Sta. Bull. 333: 297-301. 1933.
7. Etcheverrigaray ME, Oliva GA, Gonzalez ET, Noretto EO, Martín AA. Comportamiento de una cepas de HVE-1 aislada de un feto abortado. Rev. Mil. Vet. 30: 138-139. 1982.

8. Fuentealba NA, Martín Ocampos GP, Sguazza GH, Tizzano MA, Pecoraro MRI, Galosi CM. Análisis de la región intergénica entre los Orf 62 y 63 de cepas de herpesvirus equino 1 aisladas de diferentes casos clínicos. XXIV Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Virología, Córdoba 22-25 de octubre de 2006
9. Galosi CM, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME. Aplicación de la técnica de Hemólisis Radial Simple para el diagnóstico serológico del virus Herpes Equino tipo 1. *Avances en Ciencias Veterinarias* 4: 108-112. 1989.
10. Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gomez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. Equine herpesvirus-1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 8 (1):117-122. 1989.
11. Galosi CM, Nosetto EO, Tohya Y, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico del Virus Herpes Equino-1 (EHV-1). *Rev. Med. Vet. Bs As*, Vol.74 N° 5: 275-278. 1993.
12. Galosi CM, Vila Roza MV, Oliva GA, Pecoraro MR, Echeverría MG, Corva SG, Etcheverrigaray ME. A polymerase chain reaction (PCR) for detection of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in routine diagnostic submissions of tissues from aborted fetuses. *J. Vet. Med. B* 48 (5): 341-346. 2001.
13. Galosi CM, Echeverría MG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. Virus herpes equino tipo 1 (EHV-1): patrones de restricción de ADN, perfiles proteicos y estudio de patogenicidad en ratones. *Analecta Veterinaria* 18, ½: 35-40. 1998.
14. Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, Tohya Y, Mikami T. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring Equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 31 (6): 771-774. 1998.
15. Galosi CM, Barbeito C, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva S, Etcheverrigaray ME, Gimeno EJ. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Vet Microbiol* 103: 1-12. 2004.
16. Galosi CM, Martínez JP, Fernández LC, Sguazza GH, Tizziano MA, Etcheverrigaray ME, Pecoraro MRI. Estudios moleculares del gen codificante de la glicoproteína C (gC) del primer aislamiento argentino de herpesvirus equino 1 (EHV-1). VIII Congreso Argentino de Virología, Bs As 19-22 de setiembre de 2005
17. Galosi CM, Barbeito CG, Martín Ocampos GP, Martínez JP, Ayala MA, Corva SG, Fuentealba NA, Gimeno EJ. The first Argentine equine herpesvirus strain with special restriction patterns protect mice challenged with a pathogenic strain. *J. Vet. Med. B* 53, 412-417. 2006

18. Ibrahim ES, Pagmajav O, Yamaguchi T, Matsumura T, Fukushi H. Growth and virulence alterations of equine herpesvirus 1 by insertion of a green fluorescent protein gene in the intergenic region between ORFs 62 and 63. *Microbiol Immunol.* 48(11): 831-842.2004.
19. Kirisawa R, Hosoi Y, Yamaya R, Taniyama H, Okamoto M, Tsunoda N, Hagiwara K, Iwai H. Isolation of equine herpesvirus-1 lacking glycoprotein C from a dead neonatal foal in Japan. *Arch.Virol.* 150(12): 2549-2565. 2005.
20. Kydd JH, Townsend HGG, Hannant D. The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*111: 15-30. 2006.
21. Martín Ocampos GP, Fuentealba NA, Cid de la Paz V, Ayala MA, Cagliada MP, Corva SG, Gimeno EJ, Barbeito CG, Galosi CM. Investigaciones sobre el mecanismo patogénico del virus herpes equino 1 en la producción de abortos (resultados preliminares) Reunión Internacional de la Asociación Argentina de Veterinaria Equina, Bs As 23-24 de noviembre. 2006.
22. Martínez JP, Fernández LC, Martín Ocampos GP, Cid de la Paz V, Fuentealba NA, Barrandeguy M, Galosi CM. First detection of equine herpesvirus 1 genome 1B in Argentina. *Rev. Sci.Tech.Off.Int.Epizz* Vol.25 N°3: 1075-1079. 2006.
23. Minke JM, Audonnet JC, Fischer L. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 35: 425-443. 2004.
24. Nosetto EO, Galosi CM, Oliva GA, González ET, Etcheverrigaray ME. Obtención de antígeno para el diagnóstico de Rinoneumonitis Equina (HVE-1) por la prueba de doble inmunodifusión en agar (DIDA) *Rev.Med.Vet.* Vol.66 N°5: 298-301. 1985.
25. Nosetto EO, Monina MI, Baschar H, Galosi CM, Gallo G, Idiart JR, Gimeno EJ. Síndrome neurológico asociado a herpes virus equino tipo 1 (HVE-1). *Med. Vet.* 2, 583-588. 1985.