

-TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS-

1988

ESTUDIO DEL ESTADO INMUNITARIO EN EQUINOS INFECTADOS
NATURALMENTE Y VACUNADOS CON VIRUS HERPES EQUINO - 1

POR LA MÉDICO VETERINARIO CECILIA MONICA GALOSI*

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELISA ETCHEVERRIGARAY

CÁTEDRA DE VIROLOGÍA - FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

* BECARIA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
PROVINCIA DE BUENOS AIRES.-

A MI MADRE,
A MI ESPOSO y
A MIS HIJOS

Mi reconocimiento

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las Becas otorgadas que me permitieron la realización de este trabajo.-

Mi agradecimiento

A la Dra María Elisa Etcheverrigaray por su apoyo desde mi inicio en la Investigación .-

A la Dra Graciela A. Oliva y a su esposo por su especial colaboración y permanente estímulo.-

A la Dra Ester T. Gonzalez y al Dr Edgardo O. Nosetto por los consejos y sugerencias aportadas y por su valiosa ayuda en la corrección y redacción del trabajo.-

A todos mis compañeros de Laboratorio, profesionales y técnicos, por su permanente buena disposición y contínuo apoyo.-

Al Dr Reynaldo Fonrouge por el análisis estadístico realizado.-

Al Dr Julio R. Idiart por la ayuda prestada en la corrección de la redacción.-

-MINISTERIO DE EDUCACION Y JUSTICIA DE LA NACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA-

Presidente:	Dr. L.A. PLASTINO
Vice Presidente:	Ing. O.A. IGLESIAS
Secretario General:	Ing. C.M. RASTELLI
Secretario de Asuntos Académicos:	Lic. J.C. BARANDIARAN
Prosecretario General:	Méd. G.P. CASTELLARI
Secretario de Asuntos Jurídico-legales:	Dra. T.E. BENGARDINI
Secretaría de Extensión cultural y difusión:	Prof. S.S. KNIGHT
Guardasellos:	Ing. Agr. A. RINGUELET

-UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA-

-FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS-

DECANO	Méd.Vet.H.N.García Valenti
VICE-DECANO	Dr. J.O. Errecalde
SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS	Méd.Vet.A. Baldo
SECRETARIO DE EXTENSION UNIVERSITARIA	Méd. Vet.R. Bruniard
SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINST.	Cont. E. A. Silvera
SECRETARIA ADMINISTRATIVA	Sra. Mabel E. de Casamiquela
DIRECTORA DE ENSEÑANZA	Sra. C. Giuffré
DIRECTORA DE BIBLIOTECA	Sra. A. M. Bernardi

-CARRERA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS-

PRIMER AÑO

ANATOMIA DESCRIPTA Y TOPOGRAFIA	Dra.C.Alonso Prof.Adj.Int.a c/c
HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA	Dr. F. Moreno Prof.Tit.
INTRODUCCION A LA BIOQUIMICIA	Dr.A. Catalá Prof.Tit.
INTRODUCCION A LA BIOFISICA	Dr. A.Noia Prof.Adj.Int.a c/c

SEGUNDO AÑO

ANATOMIA COMPARADA	Dra.C.Alonso Prof.Adj.Int.a c/c
PATOLOGIA GNEERAL	Dr.A.Martín Prof.Tit.Int.
FISIOLOGIA	Dr.E.Zaccardi Prof.Tit.
MICROBIOLOGIA	Dr.J.Martino Prof.Tit.
GENETICA Y BIOMETRIA	Dr.F.N.Dulou Prof.Tit.

TERCER AÑO

ANATOMIA Y FISIOLOGIA PATOLOGICA	Dr. A.Martín Prof.Tit.Int.
SEMILOGIA Y PROPEDEUTICA	Dr.J.Andreata Prof.Tit.Int.
FARMACOLOGIA, FARM. y TERAP.	Dr.J.Errecalde Prof.Tit.
MEDICINA OPERATORIA	Dr. P.Videla Prof.Tit.Int.
PARASITOLOGIA Y ENF.PARASIT.	Dra.L.Venturini Prof.Tit.
ZOOTECNIA GENERAL Y AGROST.c/A	Dra.L.Iagrecá Prof.Adj.Int.ac/c

CUARTO AÑO

ZOOTECNIA ESP. I PARTE (Ovinos-Suinos -Caprinos)	Dr.E.Marotta Prof.Tit.Int.
ZOOTECNIA ESP. II PARTE (Bovinos y Equinos)	Dr.B.Rodriguez Prof.Tit.
ZOOTECNIA ESP.III PARTE (Aves y Pilíferos)	Dr. R.Perotti Prof.Tit.emerito
ECONOMIA AGRARIA	Dr.E. Panzoni Prof.Tit.
ENFERMEDADES INFECCIOSAS	Dr.E.Fernandez Prof.Adj.Int.ac/c
PATOLOGIA MEDICA	Dr.F.Iseas Prof.Tit.
PATOLOGIA QUIRURGICA Y PODOLOGICA	Dr.F.Boccia Prof.Tit.Int.
PATOLOGIA DE AVES Y PILIFEROS	Dr.N.Menéndez Prof.Tit.

QUINTO AÑO

TECNOLOGIA Y SANIDAD DE LOS ALIMENTOS	Dra.E.Ramirez Prof.Adj.Int.
HIGIENE EPIDEMIOLOGICA Y S.PUB.	Dr.E.Gimeno Prof.Tit.
INMUNOLOGIA GENERAL Y APLICADA	Dr.E.Pennipede Prof.Tit.Int.
REPRODUCCION ANIMAL	Dr.Sara Prof.Adj.a c/c
CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES	Dra.L.Pracca Prof.Tit.Int.
CLINICA DE GRANDES ANIMALES	Dr.E.Renner Prof.Adj.Int.a c/c

-CARRERA DEL DOCTORADO EN BACTERIOLOGIA CLINICA E INDUSTRIAL-

PARASITOLOGIA COMPARADA	Dra.R.Feldman Prof.Adj.a c/c
MICOLOGIA MEDICA E INDUSTRIAL	Dr.E.Reinoso Prof.Adj.a c/c
BIOESTADISTICA	Dra.A.Jensen Prof.Tit.Int.
ANIMALES DE LABORATORIO	Dra.C.Carbone Prof.Adj.a c/c
MICROBIOLOGIA ESPECIAL	Dra.M.Tobia Prof.Adj.Int.a c/c
INMUNOLOGIA I PARTE	Dr.E.Pennipede Prof.Tit.Int.
INMUNOLOGIA II PARTE	Dr.C.Gómez Prof.Adj. a c/c
GENETICA MICROBIANA	Dra.M.Lojo Jefe de T.P.int.ac/c
FISICA Y QUIMICA APLICADA	Dr.J.Carroza Prf.Tit.Int.
ANALISIS CLINICOS I	Dr.N.Argeri Prof.Tit.Int.
ANALISIS CLINICOS II	Dr.N.Argeri Prof.Tit.Int.
SALUD PUBLICA	Dr.F.Maliandi Prof.Tit.
VIROLOGIA	Dra.M.Etcheverrigaray Prof.Tit.Int.
MICROBIOLOGIA APLICADA	Dra.M. Tobia Prof.Adj.a c/c

- INDICE -

- LISTA DE ABREVIATURAS-----	Pag.	1
- INTRODUCCION-----	"	3
- ESTRUCTURA DE LOS HERPESVIRUS-----	"	7
MORFOLOGIA-----	"	7
ESTRUCTURA DEL ADN.-----	"	10
PROTEINAS VIRALES-----	"	15
- CICLO DE REPLICACION-----	"	18
- LATENCIA-----	"	26
- VIRUS HERPES EQUINO-----	"	32
ANTECEDENTES-----	"	33
SITUACION EN LA REPUBLICA ARGENTINA-----	"	35
- CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS DE RINONEUMONITIS Y ABORTO VIRAL EQUINO-----	"	36
MORFOLOGIA-----	"	36
COMPOSICION Y PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS-----	"	37
ESTRUCTURA DEL ADN.-----	"	37
PROTEINAS VIRALES-----	"	43
PROPIEDADES BIOLÓGICAS-----	"	47
CARACTERISTICAS ANTIGENICAS Y SEROLOGICAS-----	"	49
- PATOGENIA-----	"	51
- SIGNOS CLINICOS Y LESIONES-----	"	54
RINONEUMONITIS EQUINA-----	"	54
ABORTO EQUINO-----	"	55
MUERTE PERINATALES-----	"	56
ENFERMEDAD NEUROLÓGICA-----	"	57

- RESPUESTA INMUNE-----	Pag.	59
- EPIZOOTIOLOGIA-----	"	62
- PREVENCIÓN Y CONTROL-----	"	64
- OBJETIVO DEL TRABAJO-----	"	70
DESARROLLO DEL OBJETIVO-----	"	71
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN-----	"	71
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO-----	"	85
ESTUDIO SEROLÓGICO-----	"	90
ANÁLISIS -----	"	94
- RESULTADOS-----	"	96
- DISCUSIÓN-----	"	121
- CONCLUSIONES-----	"	135
- RESUMEN-----	"	136
- SUMMARY-----	"	137
- FOTOS-----	"	138
- BIBLIOGRAFÍA-----	"	142

-ABREVIATURAS-

Ac	Anticuerpo.-
Ac FC	Anticuerpo fijador de complemento.-
Ac IHA	Anticuerpo inhibidor de la hemaglutinación.-
Ac N	Anticuerpo neutralizante.-
Ag	Antígeno.-
C	Complemento.-
C Ag	Control de antígeno.-
CC	Control de complemento.-
C GRO	Control de glóbulos rojos ovinos.-
CME	Citomegalovirus equino.-
CS	Control de suero.-
DE	Dermis Equina.-
ECE	Exantema coital equino.-
ECP	Efecto citopatogénico.-
FC	Fijación de complemento.-
gP	Glicoproteína.-
GRO	Glóbulos rojos ovinos.-
HA	Hemaglutinación.-
H-E	Hematoxilina y Eosina.-
HSV	Herpes Simplex Virus.-
ID	Inmunodifusión.-
IF	Inmufluorescencia.-
IHA	Inhibición de la Hemaglutinación.-
Kb	Kilobases.-
Kbp	Pares de kilobases.-
MC	Medio de crecimiento.-

Mda	Milidalton.-
MEM	Medio mínimo esencial.-
MH	Mezcla hemolítica.-
MM	Medio de mantenimiento.-
PBS	Solución tampón de fosfatos.-
Pi	Post-infección.-
RFE	Riñón de feto equino.-
RNE	Rinoneumonitis Equina.-
S	Sueros.-
SF	Solución fisiológica.-
SFB	Suero fetal bovino.-
SH	Suero hemolítico.-
SN	Seroneutralización.-
STVS-G	Solución tampón de veronal sódico con 0,1% de ge <u>l</u> atina.-
TE	Timo equino.-
TK	Timidina quinasa.-
UAg	Unidad antigénica.-
UFC	Unidad fijadora de complemento.-
UH	Unidad hemolítica.-
VHE	Virus Herpes Equino.-

-INTRODUCCION-

Los miembros de la familia Herpesviridae se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (135) (Tabla n°1 y 2), existiendo aproximadamente entre 80 y 100 virus que en la actualidad se encuentran parcialmente caracterizados. De ellos, se han identificado 5 tipos en humanos, 3 en bovinos, 2 en cerdos, 3 en aves y 4 en equinos (115).-

Una de las características fundamentales de estos virus es la de permanecer en estados "latente", en los huéspedes en los cuales multiplican (52), aunque esta particularidad no ha sido demostrada firmemente en todos los miembros de esta familia (47).-

Ya que la arquitectura y la morfología del virión, es uniforme en todos los Herpesvirus, han sido clasificados en 3 subfamilias teniendo en cuenta sus propiedades biológicas:

SUBFAMILIA ALFAHERPESVIRINAE:

Comprende aquellos virus que poseen amplio rango de hospedadores naturales, rápido desarrollo en cultivos celulares produciendo un neto efecto lítico; establecen infecciones latentes pero no exclusivamente en ganglio. Comprende dos géneros: Simplexvirus (Herpes simplex 1 y 2, virus de la mamillitis infecciosa) y Poikilovirus (Varicela Zoster, Virus de la Pseudorabia porcina, Virus Herpes Equino-1).-

SUBFAMILIA BETAHERPESVIRINAE:

Poseen rango de huésped restringido; son de crecimiento lento en cultivos celulares.-

Pueden permanecer latentes en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos.-

Comprende los géneros: Citomegalovirus (Citomegalovirus humano) y Muromegalovirus (Citomegalovirus murino).

SUBFAMILIA GAMAHERPESVIRINAE:

Estos virus poseen un limitado rango de hospedadores naturales. In vitro replican en células linfoblásticas y algunos causan infecciones líticas en algunos tipos de células epiteliales y fibroblásticas.-

Comprende los géneros: Linfocriptovirus (Epstein Barr Virus), Thetalinfocriptovirus (Virus de la enfermedad de Mareck de las gallinaces) y Rhadinovirus (Herpesvirus saimiri) (115)

Tabla N° 1: ALGUNOS VIRUS DE LA FAMILIA HERPESVIRIDAE (Roizman 1985)

NOMBRE	Sinonimia	Sub-familia	G-C (mol%)	Tipo Genómico
<u>Virus de humanos</u>				
Virus Herpes 1	Virus Herpes Simplex tipo 1	α	67	E
Virus Herpes 2	Virus Herpes Simplex tipo 2	α	69	E
Virus Herpes 3	Virus Varicela-zoster	α	46	D
Virus Herpes 4	Virus Epstein-Barr	γ	59	C
Virus Herpes 5	Citomegalovirus	β	57	E
<u>Virus de primates</u>				
Virus Herpes Aotiane 1	Virus Herpes aotus tipo 1	β	56	E
Virus Herpes Aotiane 2	Virus Herpes aotus tipo 2	γ	--	B
Virus Herpes Aotiane 3	Virus Herpes aotus tipo 3	β	56	E
Virus Herpes Ateliane	Virus Herpes ateles cepa 810	γ	48	B
Virus Herpes Cercopithecus 2	SA8	α	67	E
Virus Herpes Cercopithecus 12	Virus Herpes papio Virus Herpes baboon	γ	--	C
Virus Herpes Pongiane 1a	Virus Herpes chimpancé. Virus Herpes pan	γ	--	C
Virus Herpes Saimiri 2	Virus Herpes mono squirrel Virus Herpes saimiri	γ	46	B
<u>Virus de otros mamíferos</u>				
Virus Herpes bovino 1.	Virus Rinotraqueítis Infecciosa bovina.y vulvovaginitis pustular infecciosa.	α	72	D
Virus Herpes bovino 2.	Virus de mamilitis infecciosa.	α	64	E
Virus Herpes Equino 1.	Virus del aborto equino.	α	57	D
Virus Herpes Suinol	Virus de Pseudorabia	α	74	D
<u>Virus de aves</u>				
Virus Herpes de gallinaceas 2	Virus Herpes de enfermedad de Marek	γ	46	E
Virus Herpes Meleagridide	Virus Herpes del pavo	γ	48	E
<u>Virus de pescados</u>				
Virus Herpes Ictalúridos 1.	Virus de bagre de río (CCV)	α	56	A

Tabla N°2: VIRUS HERPES PERTENECIENTES A LA SUBFAMILIA ALFAHER-
PESVIRINAE QUE CAUSAN ENFERMEDADES EN LOS ANIMALES
DOMESTICOS (Fenner y col. 1987).

VIRUS	ENFERMEDAD
Virus Herpes Bovino 1	-Rinotraqueítis infecciosa bovina -Vulvovaginitis pustular infecciosa. -Balanopostitis infecciosa -Aborto -Enfermedad neurológica
Virus Herpes Bovino 2	-Mamilitis infecciosa
Virus Herpes Caprino 1	-Conjuntivitis -Enfermedad respiratoria
Virus Herpes Suino 1	-Enfermedad de Aujeszky (pseudorabia)
Virus Herpes Equino 1	-Aborto -Enfermedad neonatal -Enfermedad neurológica
Virus Herpes Equino 4	-Rinoneumonitis Equina
Virus Herpes Equino 3	-Exantema coital
Virus Herpes Canino 1	-Enfermedad hemorrágica de los cachorros.
Virus Herpes Felino 1	-Rinotraqueítis felina
Virus Herpes Aviar 1	-Laringotraqueítis infecciosa
Virus Herpes 1 de los patos.	-Enfermedad de los patos
Virus B	-Enfermedad inaparente en monos (Parálisis en humanos)

- ESTRUCTURA DE LOS HERPESVIRUS -

MORFOLOGIA.-

Los virus de esta familia poseen un núcleo de ADN lineal de doble cadena, enrollado alrededor de un eje fibroso de origen proteico.-

Rodeando al núcleo se encuentra la "cápside", de simetría icosaédrica, de aproximadamente 100 nm de diámetro, compuesta de 162 "capsómeros", de 12,5 nm de longitud. De ellos 150 son hexámeros y 12, ubicados en los vértices, son pentámeros.-

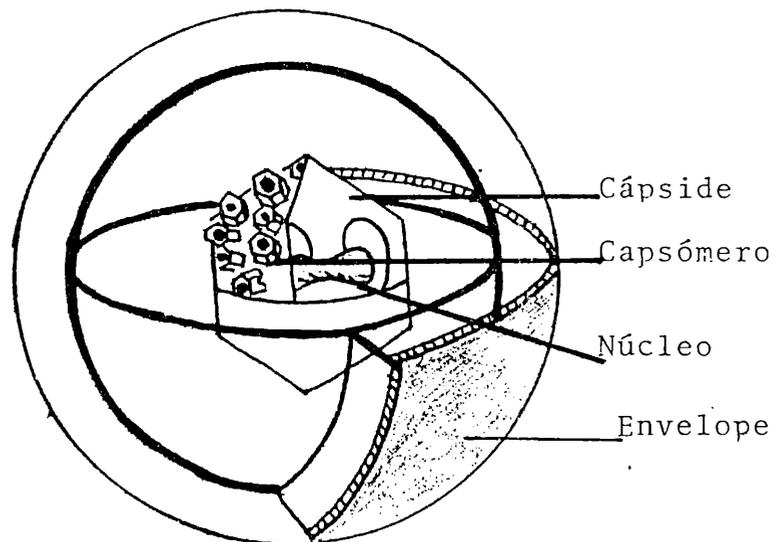
Rodeando la "cápside" y dispuesto en forma asimétrica, se halla el "tegumento", de estructura aún no definida totalmente pero del que se conocen más de 10 péptidos y demuestra ser de tipo fibroso con tinción negativa al Microscopio Electrónico.-

Por último y envolviendo al tegumento se encuentra el "envelope", envoltura de estructura trilaminar, lipoproteica, proveniente de la membrana celular modificada. Esta envoltura contiene numerosas saliencias, de aproximadamente 8 nm de longitud.-

La variación en el espesor del tegumento y la

pleomorficidad del envelope, hacen que el diámetro de los/
virus oscile entre 120 y 300 nm (24,115). (Figura N°1)

Figura N°1: MORFOLOGIA DE VIRUS HERPES (Coto, C.; de Torres,
R. 1983)



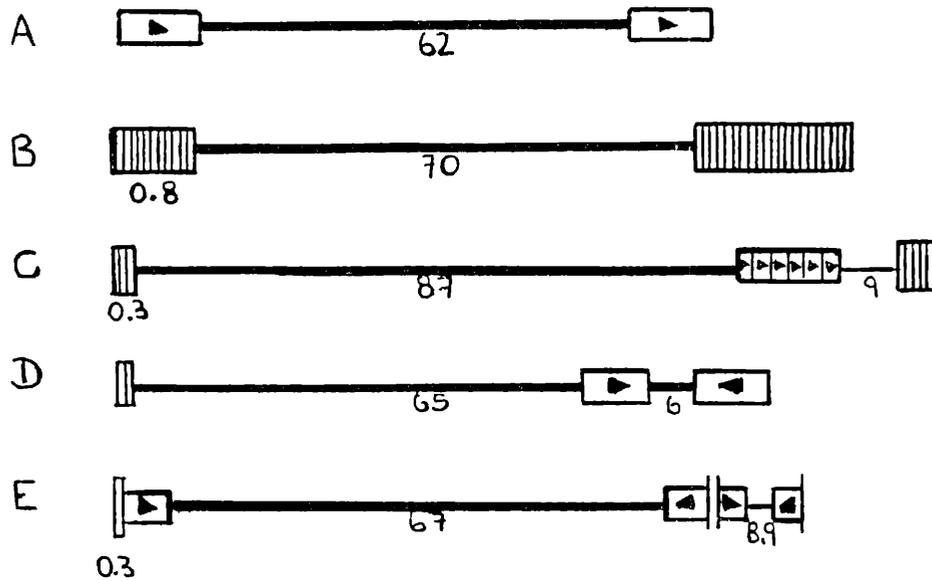
E S T R U C T U R A D E L A D N . -

La molécula del ADN, lineal, de doble cadena, de los virus Herpes presenta interrupciones y pérdida de secuencias de bases en una sólo cadena, lo que hace que este ADN se fragmente al ser tratado con álcalis. (115).-

Existen variantes entre todos los miembros de esta familia, en cuanto a composición, tamaño y estructura del ADN. Así por ejemplo, el porcentaje de G-C varía entre 32 y 74% y el tamaño entre 121 y 277 Kbp! (pares de Kilobases).-

Algunos ADN contienen secuencias terminales e internas repetidas de hasta 20 pares de Kb. (Kilobases); por ésta razón los PM varían entre 80 y 150 x 10⁶ D. y se pueden observar distintos tipos de genomas entre estos virus (115). (Figura n°2).-

Figura N° 2 : DISTINTOS TIPOS DE GENOMAS DE VIRUS PERTENECIENTES A LA FAMILIA HERPESVIRIDAE (Roizman 1985)



Referencias:

 : secuencias reiteradas de aproximadamente 1000 pares de bases.

 : orientación en la reiteración de la frecuencia

 : secuencias terminales

$\frac{N^\circ}{N}$: PM en millones

 : PM de una unidad.

El ADN de los Alfaherpesvirus, y sobre todo el del Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) fue el más estudiado (genoma tipo "E"). (Figura N° 3).

La molécula de ADN está compuesta por dos regiones denominadas "L" y "S" que representan el 82 y el 18% de la molécula respectivamente.-

Cada una de estas regiones está constituida por secuencias únicas denominadas U"L" y U"S" rodeadas por secuencias repetidas en sentido inverso.-

TR "L" /IR "L" o ab/b´a´ representan el 12% del ADN total y rodean a U"L"; IR"S" / TR"S" o a´c´/ca rodean a U"S" y representan el 8,6% del ADN total.-

El genoma comienza y termina con una secuencia "a" y ésta también se encuentra, pero de manera invertida, a nivel de la unión de "L" y "S" ("J").-

En la secuencia terminal de "L" (TR "L") al igual que en la unión de "L" y "S" ("J"), pueden haber varias secuencias "a" pero en la secuencia terminal de "S" (TR"S") existe sólo una secuencia "a".-

"L" y "S" también pueden invertirse por recombinaciones "sitio específicas" a través de la secuencia "a", dando lugar a la formación de 4 isómeros de ADN:

P: Prototipo

I"L": Inversión de "L"

I"S": Inversión de "S"

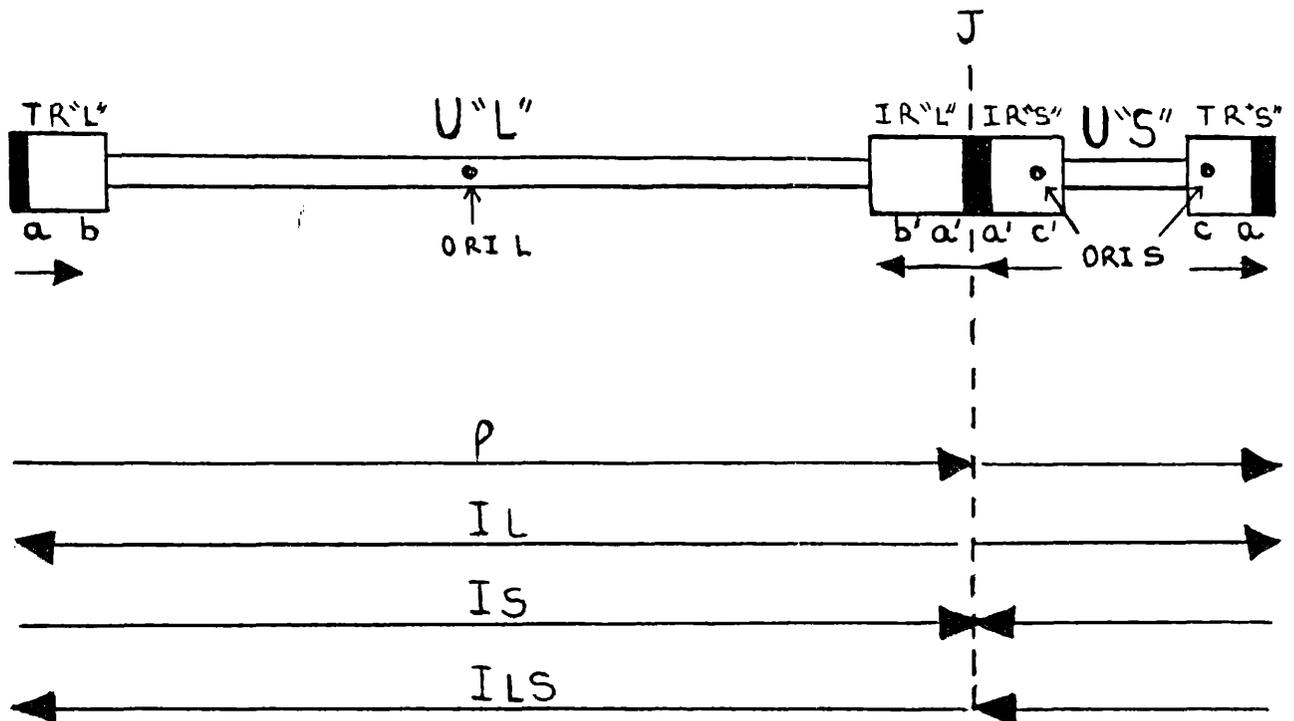
I"LS": Inversión de "L" y "S"

Todas las poblaciones de partículas virales, in-

cluso clonadas, contienen estos cuatro isómeros, pero entre los distintos miembros del mismo género, existen variaciones cuyo número y sitio pueden ser reconocidos mediante el análisis por enzimas de restricción.-

Algunos virus dentro del mismo género, como el caso de los Simplexvirus y también los Linfocriptovirus, presentan homología de secuencia de bases por hibridización; mientras que esto no ha sido demostrado aún entre virus de géneros no relacionados. Sin embargo se han encontrado regiones homólogas entre ADN de los Herpesvirus y de sus hospedadores. (115).

Figura N° 3: GENOMA DE HERPES SIMPLEX-1 (HSV-1) (Enstein 1986)



Referencias:

U^L : secuencia única "L"

U^S : secuencia única "S"

: secuencias repetidas

"J" : unión de U^L y U^S

TR^L : secuencia terminal de "L"

TR^S : secuencia terminal de "S"

P , IL , IS , ILS : isómeros por recombinación de "L" y "S"

P R O T E I N A S V I R A L E S . -

En general, en todos los virus Herpes, las proteínas estructurales varían entre 15 y 35, divididas por su localización en tres categorías: proteínas de la cápside, del tegumento y de la membrana (47)

Si bien el número de estos polipéptidos "estructurales" es muy grande, en determinados casos, se considera que algunos, denominados "menores" pueden ser precursores de otros componentes del virión, como tampoco debe descartarse la posibilidad de que algunos sean "no estructurales" y queden atrapados en la estructura del virión (115).

Proteínas de la Cápside:

En HSV-1 se ha demostrado que antes de incorporar el ADN, las cápsides vacías contienen 4 polipéptidos denominados VP5, VP19c, VP23 y VP24.-

VP5 es el que se encuentra en mayor proporción (850 a 1.000 moléculas por virión). VP23 está asociada con una actividad enzimática de tipo proteína quinasa (PK).-

Las cápsides con el ADN incorporado presentan otros dos polipéptidos denominados VP21 y VP22a. (61)

Proteínas de la Membrana:

Hasta el momento han sido identificados 6 glicoproteínas genética y antígenicamente diferentes denominadas gB (VP7 a VP8,5), gC (VP8), gD (VP17 y 18), gE (VP12,3 y VP12,6), gG y gH.-

Estructuralmente las glicoproteínas poseen, en el extremo N-terminal, una secuencia corta entre 15 y 40 residuos, muy hidrofóbica, que constituye el péptido señal que permite ligarse a las moléculas y que atraviesen el retículo endoplásmico. Esta secuencia es clivada posteriormente y por lo tanto no aparece en las glicoproteínas maduras.-

En el extremo C-terminal de las glicoproteínas gB, C y D se presentan dos regiones: una hidrofóbica seguida de otra hidrofílica. La primera constituye la región de fijación en las membranas celulares y la segunda queda en contacto con el citoplasma.-

El extremo N-terminal es expuesto al exterior de las células; posee oligosacáridos asociados que son incorporados a los péptidos nacientes durante la traducción y luego son modificados en su pasaje por el sistema de Golgi para así formar parte de las glicoproteínas maduras. En el caso de las glicoproteínas gB se observó que algunas de las cadenas no se modifican (47)

La función de las glicoproteínas gC, D, E y G es desconocida mientras que la gB parece ser necesaria para la fusión del envelope con la membrana plasmática durante,

el estado inicial de la infección. (79).

Proteínas del Tegumento:

Existen aproximadamente 10 polipéptidos de función desconocida. Se observa además una actividad de tipo ATPasa que tiene la particularidad de ser fácilmente solubilizada, mientras que la actividad proteína quinasa (PK) no puede ser disociada de la cápside. Se sugiere que ambas intervienen en los intercambios de radicales fosfatos.-

VP 16 podría estar encargada de activar la transcripción de los alfagenes durante el ciclo de replicación (48) .

-CICLO DE REPLICACION-

La estructura viral responsable de la adsorción del virus a las células huéspedes, no ha sido identificada totalmente.-

El virus se une a receptores celulares y rápidamente se produce la fusión del envelope con la membrana celular o la formación de un endosoma. Inmediatamente la cápside es transportada al núcleo donde es liberado el ADN y tiene lugar la transcripción, replicación y ensamble de las cápsides. (Figura N° 4).

A D S O R C I O N.-

Se realiza en receptores específicos sobre la membrana celular, aún no caracterizados en totalidad.-

Las glicoproteínas de la envoltura viral son las que permiten la adsorción y la penetración del virus en la célula.-

P E N E T R A C I O N.-

Se produce por fusión de la membrana plasmática con el envelope viral debido a un proceso de activación mediado por las proteínas de la envoltura. Esta teoría es la

que actualmente se encuentra más aceptada en lugar de aquella que sostiene que se produce por un mecanismo de fagocitosis, ya que al trabajar con mutantes termosensibles de HSV-1 se comprobó que la glicoproteína B se adsorbía pero no penetraba en la célula. (115).

DECAPSIDACION.-

Luego de ser transportadas hasta la membrana nuclear las cápsides la atraviesan y se libera el ADN dentro del núcleo (47).

Toda esta secuencia de eventos se suceden gracias a la acción de todos los componentes del virión, que protegen y facilitan la entrada del ADN viral como también frenan la síntesis temprana de macromoléculas del hospedador y participan directamente en la replicación induciendo la expresión de alfa genes (α). Estos alfa genes, junto con los beta (β) y los gama (γ), constituyen una serie de polipéptidos sintetizados en las células infectadas pero que no forman parte de la partícula viral.-

La síntesis de estos polipéptidos esta regulada, de un modo coordinado, se desarrolla en forma secuencial o en cascada y en presencia de polipéptidos virales que activan la síntesis del grupo siguiente e inhiben el grupo precedente. (47).

P O L I P E P T I D O S A L F A (α).-

No necesitan de polipéptidos previos para ser sintetizados.-

Son los únicos que transcriben cuando la célula es infectada en presencia de inhibidores de la traducción.

En HSV-1, hasta el momento, se identificaron 5 polipéptidos alfa cuya síntesis es mayor a las 2 horas post-infección (pi).-

Estos polipéptidos se caracterizan por ser fosforilados y capaces de asociarse al ADN; son "no estructurales" y actúan como reguladores. (115).

P O L I P E P T I D O S B E T A (β).-

Se caracterizan por ser sintetizados "de novo" a partir de la transcripción de otras secuencias genómicas, pero requieren de la presencia de uno o dos polipéptidos alfa. La síntesis es mayor entre las 5 y 7 horas pi.-

En general son "no estructurales" y algunos actúan regulando la síntesis de polipéptidos alfa, de macromoléculas celulares y además activan la síntesis de polipéptidos gama.-

P O L I P E P T I D O S G A M A (γ).-

Se sintetizan "de novo" a partir de secuencias

del genoma pero requieren la presencia de algunos polipéptidos alfa y beta.-

La mayor parte son "estructurales" pero algunos actúan como reguladores inhibiendo la síntesis de polipéptidos alfa del ciclo siguiente de replicación.-

Existen dos tipos de polipéptidos gama:

Polipéptidos gama 2: Requieren la síntesis del ADN viral. Inician su síntesis entre 6 y 7 horas pi y su concentración aumenta hasta la lisis de la célula.-

Polipéptidos gama 1: Son independientes de la síntesis del ADN viral y su cinética de síntesis es casi paralela a la de los polipéptidos beta. Al igual que los polipéptidos gamma 2, su concentración aumenta hasta la lisis celular. Se caracterizan por formar parte de la capsida. (47,69).

T R A N S C R I P C I O N . -

El ADN es transcrito por la ARN polimerasa II del hospedador pero con la participación de todos los componentes del virión.-

Organización Funcional del Genoma:

Dentro de los miembros de la familia Herpesviridae, el HSV-1 es el que se describe como modelo de organización y estructura del genoma.-

En la primera fase de la expresión del genoma vi

ral, sólo son transcritos 5 genes que dan lugar a la formación de los 5 polipéptidos alfa o "precoces". Dos de estos genes ($\alpha 4$ y $\alpha 0$) se encuentran localizados en TR"L"/IR"L" y IR"S"/TR"S" respectivamente. Alfa 22 y alfa 47 se encuentran en parte en las secuencias únicas de "S" y alfa 27 está en su totalidad localizado en las secuencias únicas de "L".

Estos genes alfa se ubican en dos grupos, el primero formado por alfa 27, 0,4 y 22 y el segundo por alfa 47, 4 y 0; sin embargo cada uno es transcripto a partir de un promotor independiente por la ARN polimerasa celular. (115).

El gen más estudiado es el alfa 4 que actuaría, inhibiendo su propia síntesis y de la de otros polipéptidos alfa. (47).

Otros virus Herpes, incluyendo al de la Pseudorabia porcina, cercano filogenéticamente a HSV-1, inducen la síntesis de un sólo polipéptido alfa, homólogo al alfa 4. (70).

Los genes beta se encuentran codificados en las secuencias únicas del genoma viral y la mayoría se agrupan alrededor del sitio de iniciación de la replicación (ORI "L").(115).

Los dos genes beta más estudiados son el timidina quinasa (TK) y el de la glicoproteína D (gPD). Para que se inicie la transcripción de los mismos es necesario el polipéptido alfa 4 y posiblemente algún otro. Se sabe

además que puede ser activado por polipéptidos homólogos de otros virus y algunos heterólogos de algunos Adenovirus.-

Los genes que codifican las funciones gama se encuentran en las secuencias únicas del genoma y se los suele encontrar agrupados en determinados puntos. (47,69)

R E P L I C A C I O N D E L A D N - E N C A P S I D A - C I O N . -

Comienza aproximadamente 3 horas pi y alcanza su máxima entre las 6 y 9 horas pi. El mecanismo exacto de replicación, donde actuarían los polipéptidos beta, no es del todo conocido, pero se sugiere que el genoma se circulariza formándose "estructuras replicativas" unidas por sus extremidades (modelo de "círculo rodante").-

Hasta el momento existen tres secuencias de origen de la replicación, una denominada ORI"L" localizada en la región única de "L" y rodeada de dos funciones beta (ADN polimerasa y beta 8); la segunda, denominada ORI"S" ubicada en las secuencias repetidas que rodean a "S" y rodeada de alfa 4 y alfa 22 (ORI IR"S") y de alfa 4 y alfa 47 (ORI TR"S"). La tercera secuencia ("a") es necesaria para la circularización, encapsidación y clivaje del ADN, como también es donde se producen las inversiones que dan lugar a la formación de los cuatro isómeros del ADN. (115)

El clivaje de las estructuras replicativas y la

encapsidación del genoma son sincrónicos. En la maduración de los viriones, primero se forman las cápsides, luego penetra la unidad genómica y posteriormente se produce el clivaje.-

Algunos polipéptidos gama (VP21 y 22) participan en esta etapa de encapsidación y en la formación del eje en el cual se enrolla el ADN. Otros (VP19) participan en la asociación de la cápside con el ADN.-

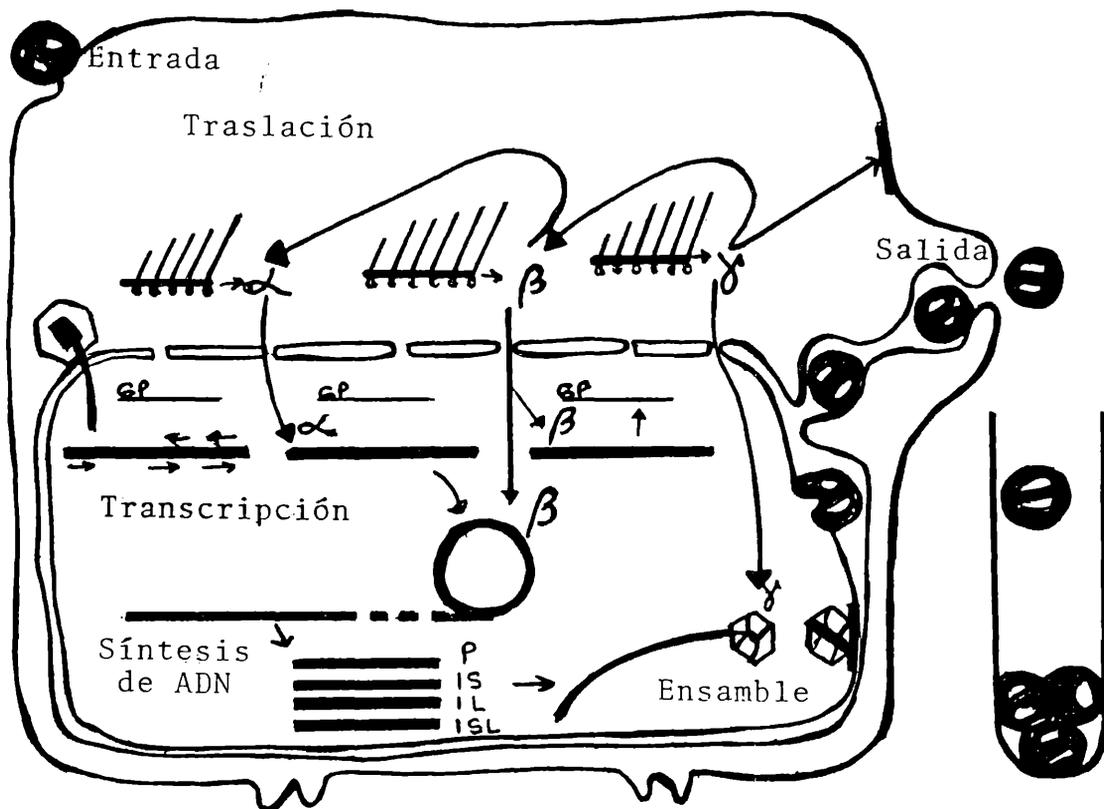
Finalmente, la cápside con el genoma incorporado, se asocia a la lámina interna de la membrana nuclear y pasa al citoplasma. (47,115).

LIBERACION DE LAS PARTICULAS INFECIOSAS.-

Las partículas virales formadas atraviesan el citoplasma celular por las cisternas del retículo endoplásmico, vía aparato de Golgi y luego por un mecanismo de fagocitosis inversa abandonan la célula. (73).

Las glicoproteínas virales intervienen en la liberación de los viriones, dado que se produce interacción de las membranas virus-célula.(47,115).

Figura N° 4 : CICLO DE REPLICACION DE HERPES SIMPLEX-1 (HSV-1)
 (Roizman 1985).

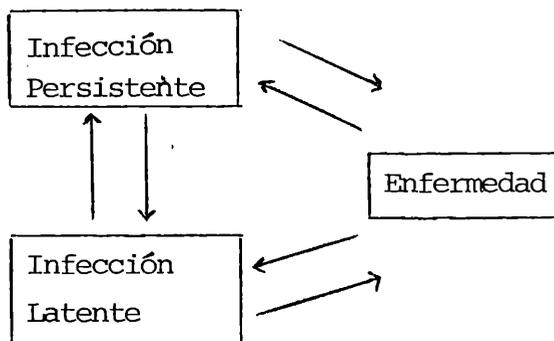


-LATENCIA-

Una de las características más importantes de los miembros de la familia Herpesviridae es la capacidad de permanecer en el huésped en estado "latente", haciendo que el mismo se transforme en un "portador silencioso" del virus a pesar de ser inmunocompetente.(115).

A diferencia de la infección "persistente", en la cual el virus es recobrado continuamente del huésped, con manifestaciones clínicas o no, la infección "latente" es aquella en la cual el virus permanece en el huésped en una forma oculta, y es detectado sólo "intermitentemente" y asociado con recrudescencia clínica de la enfermedad. (75)

Esto es de fundamental importancia para el entendimiento de la epizootiología de las infecciones producidas por estos virus, ya que, luego de meses y hasta años de sucederse una infección primaria, el virus no es erradicado del huésped, puede reactivarse e iniciar nuevos brotes de enfermedad. (113).



Se describen tres localizaciones de latencia: nerviosa, epitelial y linfoide. Así por ejemplo el virus de la Enfermedad de Mareck (Herpesvirus de las gallinaceas) correspondientes a la subfamilia Gamaherpesvirinae posee una localización linfoidea. El Citomegalovirus humano, de la subfamilia Betaherpesvirinae puede establecer latencia en glándulas salivales, linfocitos del bazo y riñones. Aquellos virus pertenecientes a la subfamilia Alfaherpesvirinae pueden presentar latencia en tejidos nerviosos como así también epiteliales. (67). (Figura N° 5).

Se han propuesto dos modelos explicativos para comprender el fenómeno de latencia, el primero o "Modelo Estático", propone que el virus no replica pero, permanece en el ganglio donde se conserva la información genética. El segundo o "Modelo Dinámico", sostiene que el virus sí replica en el ganglio. (129).

La primera hipótesis es la que se considera más probable debido a que para el establecimiento del virus en estado latente no es absolutamente necesaria la multiplicación viral, ya que mutantes termosensibles, incapaces de multiplicar en ratones, pueden existir en forma latente. (67).

Sin embargo, la replicación del virus, aumenta la cantidad del mismo en el organismo y también la posibilidad de acceder a determinados tejidos donde se mantiene en estado latente. (75,104).

De cualquier manera, los factores que hacen que

se establezca y se mantenga la latencia no están aún totalmente aclarados. El control y los mecanismos que conducen a la reactivación, están estrechamente relacionados. El hecho de que la presencia de Ac reduzca la reactivación viral, sugiere la expresión de Ag virales en la membrana de las células infectadas y por lo tanto, la respuesta inmune tendría importancia en el control. Aún así, el rol del sistema inmune es todavía incierto. (47,81,104).

En el caso de los Alfaherpevirus, una teoría indica que en el ganglio existen células permisivas para la replicación del virus y que los Anticuerpos regulan la expresión del mismo. Una segunda teoría sostiene que existen células permisivas y otras, no permisivas y que en las primeras ocurre la infección productiva y en las segundas se establece la infección latente. En este caso la respuesta inmune eliminaría la infección productiva. La tercera posibilidad es que las células, normalmente son no permisivas, pero trastornos en el metabolismo celular pueden alterarlas, y con la infección viral se tornan permisivas. La respuesta inmune, en este caso, controlaría la extensión de la infección.-

Sin embargo, con el resultado de numerosos estudios, hoy se sabe que los anticuerpos antivirales no son los que juegan el rol más importante en los mecanismos del establecimiento de la latencia, sino que esto se encuentra bajo el control de genes virales y se requiere de la expresión de alguno de ellos.(67,129,55).

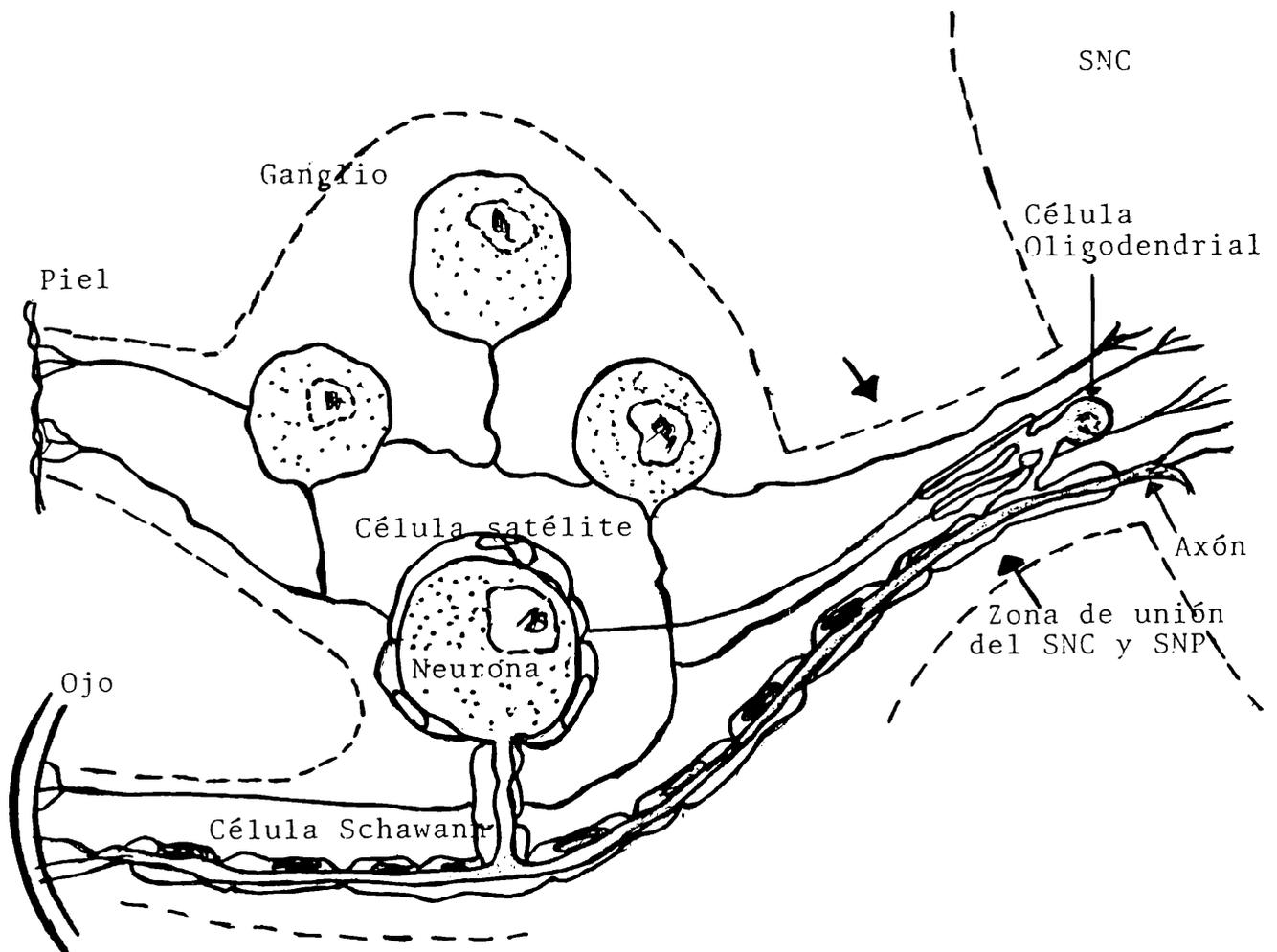
El gen timidina quinasa (TK) de HSV-1 fue el primero de latencia reconocido, pero aún está discutido, ya que mutantes de HSV-1 con pequeña producción de TK pueden permanecer en estado latente. Otros autores establecieron además mutantes de Herpesvirus Bovino 1 TK negativos que produjeron infecciones latentes. (75,81)

El genoma viral en latencia puede encontrarse integrado al ADN celular (citomegalovirus) o en forma episómica aunque en algunos casos (Epstein Barr virus) pueden coexistir.-

En muchos sistemas se ha demostrado que algunas partes del genoma se transcriben durante el período de latencia y en otros casos se define a la latencia como un bloqueo parcial de la transcripción. (129).

Sin embargo este fenómeno aún no se ha dilucidado y, en todos los Herpesvirus, los mecanismos pueden ser distintos ya que se observaron diferencias en lo concerniente a la localización, estado del genoma viral, frecuencia de reactivación y estímulo que la provocan y, además, sobre todo, es de suma importancia la interacción virus huésped (Estrés, Avitaminosis, Radiaciones, Lesiones Epiteliales, Tratamientos Prolongados con Inmunosupresores). (57,67,104,113,114.). (Figura N° 6)

Figura N° 5: ESQUEMA ILUSTRATIVO DE LAS CARACTERISTICAS ANATOMICAS DEL GANGLIO SENSORIAL Y NERVIO TRIGEMINO (Hill 1986).



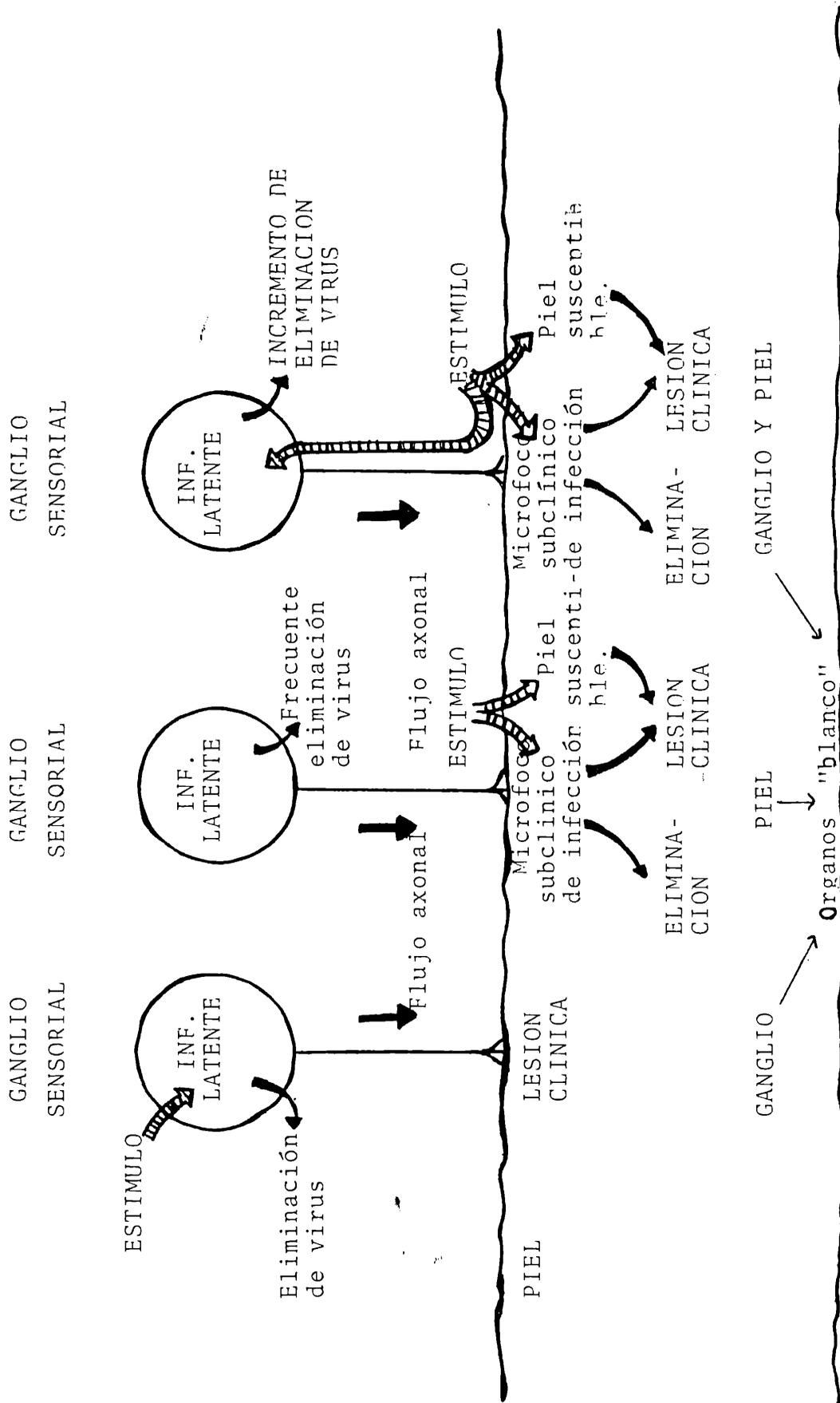


Figura N° 6 :INDUCCION DE RECURRENCIAS POR HERPES SIMPLEX: POSIBLES MODOS DE ACCION (Hill 1981)

-VIRUS HERPES EQUINO-

Hasta el momento se han descrito 4 virus pertenecientes a la Familia Hesperiviridae que afectan a los equinos (115) :

SUBFAMILIA ALFAHERPESVIRINAE:

- Virus Herpes Equino tipo 1 (VHE-1): Virus del Aborto Viral Equino.-

- Virus Herpes Equino tipo 4 (VHE-4): Virus de la Rinoneumonitis Equina (RNE).-

- Virus Herpes Equino tipo 3 (VHE-3): Virus del Exantema Coital Equino (ECE).(16,31,124).

SUBFAMILIA BETAHERPESVIRINAE:

-Virus Herpes Equino tipo 2 (VHE-2): Citomegalovirus Equino (CME).-

VHE-1 y VHE-4 pertenecen al género Poikilovirus (98).

VHE-1 produce cuadros de aborto (4), generalmente de tipo epizoótico, muertes perinatales (21) y enfermedad neurológica (22,28,33,56,64,72.) aunque ocasionalmente pueden producir RNE.-

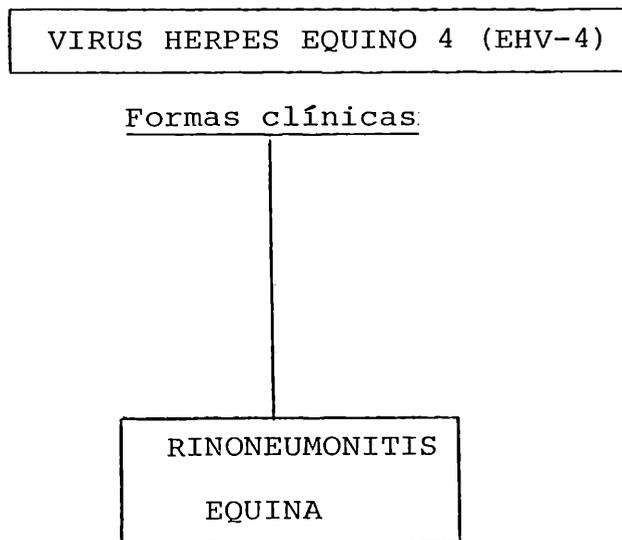
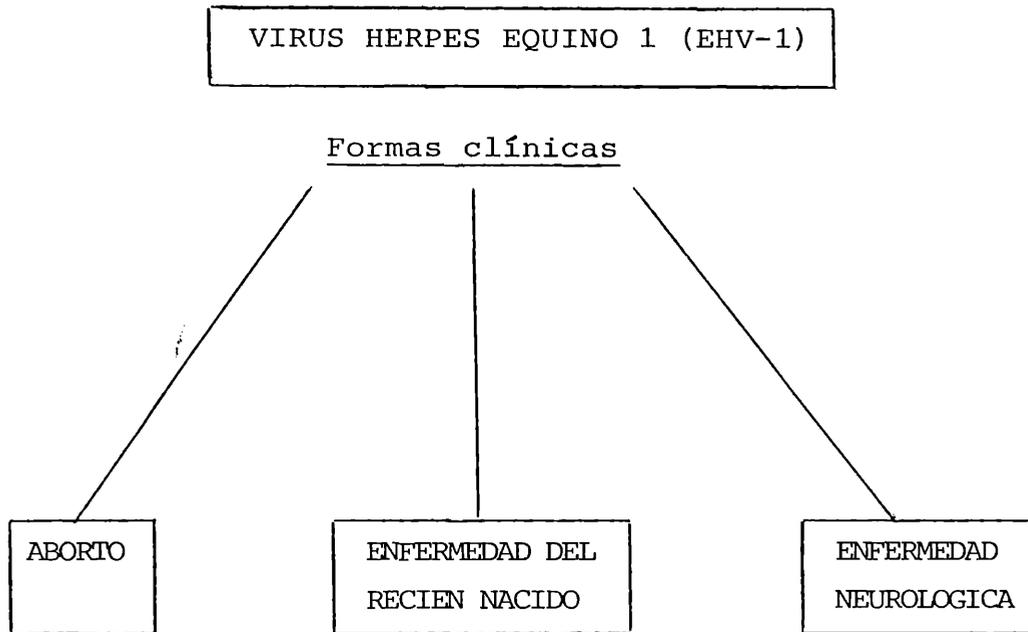
VHE-4 es el principal agente productor de infecciones del tracto respiratorio superior (37) pero además ha sido considerado como el causante de abortos esporádicos. (52).

A N T E C E D E N T E S.-

El VHE-1 fue aislado por primer vez de material de fetos abortados en USA (1933) por Dimock y Edwards (32) habiendo, no obstante, antecedentes de cuadros de abortos desde 1922 (133). Posteriormente se descubrió un agente viral abortivo en Alemania, Yugoslavia y Hungría en 1937 y 1938, en Austria en 1941, en Sud-Africa en 1946, en España, Polonia y Suecia en 1950, en Francia en 1951, en Japón en 1950 y en Irlanda en 1961.(9,51,74,86).

Manninger y colaboradores (1941-1949) asociaron a este patógeno con el virus de Influenza Equina y el virus de Arteritis Viral Equina (37), hasta que, en 1963, Plummer y Waterson lo clasificaron como miembro de la familia Herpesviridae y lo denominaron Herpes Virus Equino tipo 1. (110).

Actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo (83,116,121) y hasta hace muy poco se consideraba que se trataba de un sólo virus (VHE-1) con dos subtipos de propiedades físico-químicas y biológicas definidas y con características patogénicas propias: el VHE-1 subtipo 1 que produce formas clínicas con sintomatología respiratoria, nerviosa, abortos y muertes perinatales y el VHE-1 subtipo 2 asociado con cuadros clínicos de tipo respiratorio (2,17,29,45,105,131). Actualmente se sabe que se trata de dos virus con variaciones genéticas y antigénicas que permiten diferenciarlos (3,5,46,53, 120, 125, 127,128,137) el VHE-1 y el VHE-4, anteriormente denominadas VHE-1 subtipo 1 y VHE-1 subtipo 2 respectivamente (52).



SITUACION EN LA REPUBLICA ARGENTINA.-

La existencia de esta enfermedad en la República Argentina fue comunicada por primera vez por los Dres. Monteverde y Garbers en 1949. (31).

Posteriormente en 1965, Matumoto y colaboradores detectaron mediante estudios serológicos, Anticuerpos (Ac) específicos contra el VHE-1(83) y en 1978, un análisis realizado mediante el uso de la técnica de Inmunodifusión (ID) en equinos pertenecientes a dos haras de la Provincia de Buenos Aires con antecedentes clínicos de esta virosis, demostró la existencia de 25% de reactores. El Antígeno (Ag) que se utilizó para la realización de este estudio se elaboró mediante la inoculación intraperitoneal a hamsters de Siria lactantes, de una cepa de referencia adaptada a dicha especie.(41,50).

En el año 1980 se aisló el virus a partir de un feto equino abortado (49) y esta cepa, denominada SP-1 fue utilizada posteriormente para la obtención en cultivos celulares de un Ag precipitante. (99).

En el año 1984 se describieron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa asociada con este virus y se comunicó el aislamiento a partir de cerebro de un equino SPC que presentaba sintomatología.(96,101)

Por último en 1985, se realizó un aislamiento a partir de leucocitos de un equino con cuadro clínico respiratorio. (57,62).

-CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS
DE RINONEUMONITIS EQUINA Y
ABORTO EQUINO-

MORFOLOGIA.-

VHE-1 y 4 poseen todas las características morfológicas de los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae.-

El genoma está constituido por ADN lineal de doble cadena. El tamaño del "core" es de 25-30 nm. de diámetro. (124).

La cápside es de simetría cúbica y está formada por 162 capsómeros alargados de los cuales 150 son de sección hexagonal y 12 (ubicados en los vértices) son pentagonales. El diámetro aproximado de la nucleocápside es de 100-110 nm. (102).

Externamente poseen una envoltura lipoproteica, laxa, denominada "envelope", que le confiere al virión una forma ligeramente redondeada y un diámetro final de 150-170 nm. (24).

COMPOSICION Y PROPIEDADES
FISICO - QUIMICAS.-

El genoma viral posee un PM de 92×10^6 a $93,8 \times 10^6$ D. (66,94) y una composición de G + C de 56% (134) con un coeficiente de sedimentación de 49-52 S. (102).

La densidad de flotación de los viriones en gradiante de sacarosa y tartrato de potasio es de $1,18 \text{ g/cm}^3$, en gradiente de cloruro de cesio es de $1,27 \text{ g/cm}^3$ y de $1,08 \text{ g/cm}^3$ en silicagel. (59)

Debido a la composición lipídica de la envoltura, los virus son sensibles a solventes de lípidos (eter-cloroformo) y al tratamiento con tripsina (119). En medios de cultivo con suero y a 4° C pierden su infectividad entre 3-6 meses, a temperatura ambiente en 8 días, a 37° C entre 24 y 48 horas y a -70° C mantiene su título infeccioso durante varios meses. Son estables entre valores de pH de 4 a 10 (6,59) pero son sensibles a pH 3 o menor. (17).

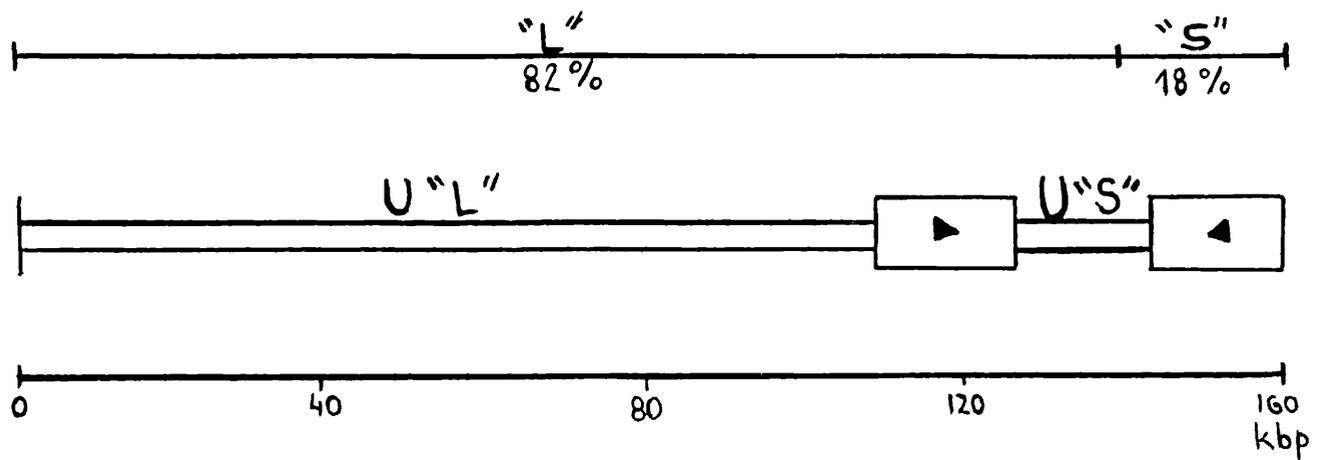
ESTRUCTURA DEL ADN.-

En VHE-1 y VHE-4 el ADN, de doble cadena, lineal, está ordenado en dos regiones unidas covalentemente: un segmento "L", fijo, de 72 Mda (Milidaltón) y uno "S" de 20 Mda, que es capaz de dar una inversión relativa al segmento "L".-

La terminación de "S" contiene secuencias repetidas, invertidas, de 7 Mda. (Figura N° 7).

Como resultado de la habilidad del segmento "S" de invertir a la región "L", se presentan dos isómeros de ADN. (2,25).

Figura N° 7 : ESTRUCTURA DEL GENOMA DE VIRUS HERPES EQUINO TIPC 1 Y 4
(Fenner y col. 1987).



Referencias:

U "L" : secuencia única "L"

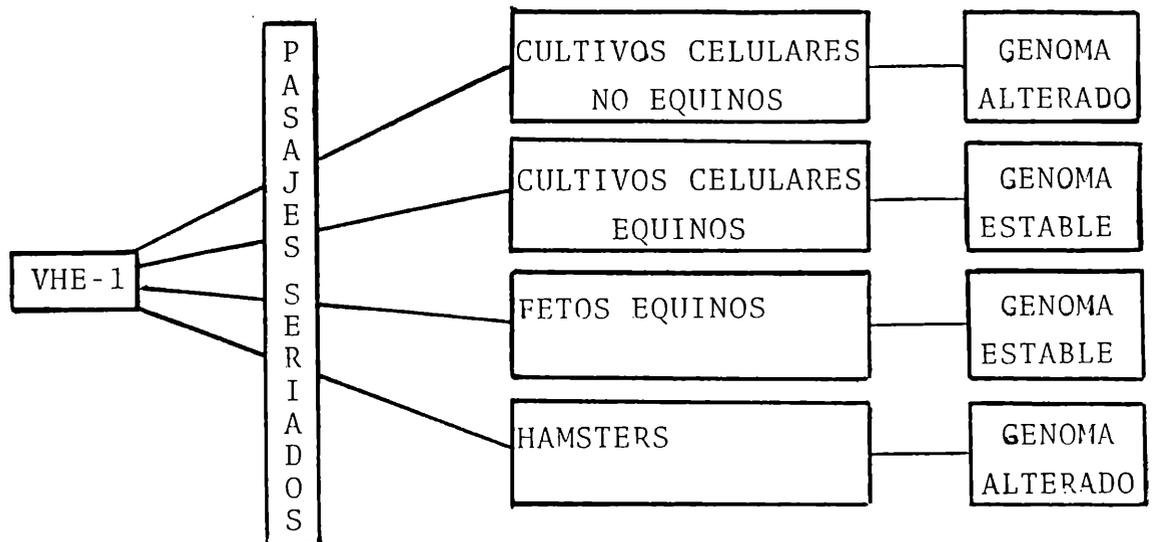
U "S" : secuencia única "S"

En el año 1981, Henry y colaboradores, realizaron los mapas genómicos de dos cepas de VHE-1 (LM y HVS 25) utilizando el análisis por enzimas de restricción. Observaron grandes diferencias en la distribución de los sitios de clivaje para cada una de las enzimas utilizadas, resultante esto de seriados pasajes de dichas cepas en cultivos de células no equinas y en hamsters; mientras que el genoma se mantuvo estable cuando los pasajes se hicieron en células equinas. (Figura N° 8).

Las variaciones encontradas consistieron en:

- a) Aumento o disminución de los sitios de clivaje;
- b) Pequeñas alteraciones en el tamaño y la movilidad electroforética de los fragmentos, producidos por las enzimas de restricción, debidas específicamente a la variación en el número de copias de secuencias repetidas de "S".(66).

Figura N°8 : EFECTO DE PASAJES SERIADOS SOBRE EL GENOMA DE VIRUS
HERPES EQUINO TIPO 1 (VHE-1) (Allen y Brvans 1986).



Teniendo en cuenta la estabilidad genómica del VHE-1 demostrada durante pasajes en células equinas se concluye que los estudios por enzimas de restricción constituyen la herramienta más valiosa para la diferenciación de cepas virales.-

Hasta el momento sólo se sabe que existe menos de un 20% de homología de bases entre los ADN genómicos de VHE-1 y VHE-4 pero se desconoce aún las propiedades físicas, estructura isomérica y mapeos genómicos del ADN de VHE-4. (2,52).

Sólo el 14% del número total de los sitios de clivaje reconocidos por 5 enzimas de restricción en el ADN genómico de VHE-1 variaron sobre 235 aislamientos realizados de animales infectados naturalmente (origen no vacuinal). (2).

Este hecho, junto con la observación de que el 67% de las epizootias de aborto producidas, fueron causadas por VHE-1 y no pudieron ser diferenciadas por el "fingerprinting DNA", indican que las diferentes cepas de VHE-1 no exhiben una amplia variabilidad genética como la encontrada entre los aislamiento de HSV-1.(115).

Sin embargo fue encontrada una mayor diversidad en el "fingerprinting DNA" patrón en aislamientos de VHE-4: 13 modelos diferentes entre 21 aislamientos de casos epizootiológicamente no relacionados. (2).

P R O T E I N A S V I R A L E S . -

Los estudios realizados por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) demuestran que el virión posee 28 proteínas estructurales específicas cuyos pesos moleculares oscilan entre 276.000 y 16.000 D. De ellas, 5 se denominan proteínas mayores y pertenecen a la nucleocapside, siendo la proteína denominada VP 9 la que se encuentra en mayor proporción representando el 65% del total de la masa proteica de la cápside. (102).

De 6 a 8 polipéptidos adicionales se encuentran en la estructura amorfa denominada "tegumento" que separa la cápside del "envelope". (2,130).

Existen 12 glicoproteínas (6 mayores y 6 menores) localizadas en el "envelope", alguna de las cuales se proyectan hacia afuera en forma de espículas cubriendo la superficie exterior del mismo. (2).

Algunas de las propiedades biológicas de la partícula viral, tales como adsorción y penetración en la célula, el tipo y la variación antigénica, residen en estas proteínas del "envelope". (106). Entre los dos tipos de VHE se observa diferencia de movilidad electroforética en VGP 2, 13, 14, 18 y 25 y en VP24a, 26a y 26b.-

VG2, 10, 13 y 14 se encuentran en ambos tipos virales y de ellas, VG2 y 14 muestran, experimentalmente, ma

yor reacción cruzada.-

VGP 18 y 22a son específicas de cada tipo (130, 131). (Tabla N°3 y Figura N° 9).

Mediante el uso de Ac monoclonales se distinguen 4 categorías de epitopes en estas glicoproteínas de superficie:

a) Determinantes específicos de cada tipo presentes en todos los aislamientos.-

b) Determinantes específicos de cada tipo presentes sólo en algunos aislamientos pero no en otros del tipo homólogo.-

c) Epitopes específicos sólo para algunos aislamientos de ambos tipos.-

d) Epitopes comunes para todos los aislamientos de ambos tipos. (119).

Tabla N° 3 : PROTEINAS ESTRUCTURALES DE VIRUS HERPES EQUINO
(Turtinen 1983).

VHE-1				VHE-4			
Proteína	Kda	Tipo	Loc.	Proteína	Kda	Tipo	Loc.
1	250	G-	E	1	250	G	E
2**	190/240	G(M)	E	2	190/240	G(M)	E
9	140	-	NC	9	140	-	NC
9a	140	G	E				
10a	128	G	E				
10	124	G(M)	E	10	124	G(M)	E
11	117	-	T	11	117	-	T
12	110	-	T				
13*	96	G(M)	E	13*	110	G(M)	E
				13a	98	-	T
				14a	94	?	?
14*	90	G(M)	E	14b*	87	G(M)	E
				14c	84	?	?
15	82	-	T	15	82	-	T
16	74	G	E	16	74	G	E
				17a	70	-	T
17	68	G	E	17	68	G	E
				18a	64	-	T
18*	63	G(M)	E	18*	61	G(M)	E
19	60	-	T	19	60	-	T
20	54	-	NC	20	54	-	NC
21	45	G	E	21	45	G	E
22a	41	G(M)	E	22a	41	G(M)	E
22b	39	-	NC	22b	39	-	NC
23	36	-	T	23	36	-	T
23a	33	-	T	23a	33	G	E
24a	31	-	NC	24a*	32	-	NC
24b	27	-	NC	24b	27	-	NC
25*	24	G	E	25*	25	G	E
26a*	18	-	T	26a*	19	-	T
26b*	17	-	NC	26b*	18	-	NC
27	16	-	T	27	16	-	T

Referencias: G: glicoproteína G(M): glicoproteína mayor
 E: envelope T : tegumento
 NC: nucleocápside
 -: no determinado
 *: diferente movilidad electroforética entre los tipos.
 **: diferente movilidad electroforética dentro del mismo tipo.

Figura N° 9 : CARACTERISTICAS GENETICAS, ANTIGENICAS, PATOGENICAS Y CULTURALES DE VHE-1 Y VHE-4 (Allen y Bryans 1986)

CARACTERISTICAS	VHE-1	VHE-4
<u>ESTRUCTURA GENETICA</u>		
- Homología en secuencias de bases	Menor de 20 %	
<u>ESTRUCTURA ANTIGENICA</u>		
- Proteínas estructurales	Diferencia de movilidad electroforética en 8 polipéptidos.	
- Determinantes antigénicos comunes	VGP 2, 10, 13 y 14	
<u>PATOGENICIDAD</u>		
- Enfermedad respiratoria (Incidencia)	Baja	Alta
- Potencial abortigénico	Alto	Bajo
- Mortalidad potrillo recién nacido	Si	No
- Paresia en equinos	Si	No
- Neurovirulencia ratón lactante	Si	No
- Viremia asociada a leucocitos	Si	No
- Tropismo por células endoteliales	Si	No
- Adaptación a hamster	Si	No
<u>CARACTERISTICAS CULTURALES</u>		
- Rango de células susceptibles	Amplio	Restringido (PK15 y células equinas)
- Tamaño de placa lítica (RFE)	< 1 mm	> 1 mm

PROPIEDADES BIOLÓGICAS.-

Solamente los miembros de la familia Equidae son huéspedes naturales de estos virus (91,95), mientras que los huéspedes experimentales incluyen hamsters de Siria lactantes y de 4-6 semanas de edad (41), ratones lactantes (6) y huevos embrionados (34,42). También pudo ser replicado en cobayos lactantes previo tratamiento con inmunosupresores. (91).

Fue propagado por primera vez "in vitro" en cultivo de tejidos equinos (6) y posteriormente en cultivos primarios de células de riñón ovino, porcino, bovino (88) y conejo (110), habiendo sido además adaptado a numerosas líneas celulares.(19,102).

- BHK-21 (riñón de hamster lactante)
- Ky ED (dermis equina)
- RK-13 (riñón de conejo)
- MDBK (riñón de bovino)
- VERO (riñón de mono verde africano)
- IB-RS-2 (riñón porcino)
- ETCC (tumor equino)
- LM (fibroblastos de ratón)

Estas líneas celulares son las que se utilizan actualmente para su estudio, replicando fácilmente el

VHE-1 en una amplia variedad de las mismas, mientras que el VHE-4 lo hace selectivamente en células de origen equino y en la línea PK15 (riñón porcino). (2). (Figura N°9

Como consecuencia de la acción del virus sobre la síntesis de macromoléculas celulares, así como de la presencia de polipéptidos virales, se producen una serie de modificaciones metabólicas y morfológicas de la célula infectada designadas como "efecto citopatogénico" (ECP). (6,17)

El primer cambio que se visualiza en monocapas celulares infectadas por este virus consiste en el redondeamiento y aumento de tamaño y refringencia de las células, con formación de sincicios debido a la condensación de los citoplasmas de las mismas. Posteriormente aumenta el número de células afectadas y comienzan a lisarse y desprenderse del vidrio. (88).

El examen microscópico de las células infectadas revela la formación de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos con marginación de la cromatina. (17,91).

Este virus tiene además la particularidad de formar placas, bajo agar, en las monocapas celulares donde replica (7,89), siendo éstas de características variadas de acuerdo con el tipo viral, la multiplicidad de infección y el tipo de célula huésped (2,68,126).

C A R A C T E R I S T I C A S A N T I G E N I C A S Y
S E R O L O G I C A S . -

Las nucleocápsides de los virus Herpes poseen Ag de grupo comunes demostrables mediante reacciones serológicas de inmunodifusión (ID) y fijación de complemento (FC) (24,109), mientras que la especificidad de tipo y subtipo reside en las glicoproteínas del "envelope". (107)

VHE-1 y VHE-4 se encuentran antigénicamente relacionados, lo que es demostrado por distintos procedimientos serológicos incluyendo la técnica de seroneutralización (SN). (52)

El virus además aglutina eritrocitos equinos y de cobayo (87) siendo la hemaglutinina (HA) un glicoproteína del "envelope" viral pobremente representada, necesitando por lo tanto 0,65 ug de proteína viral para dar una unidad hemaglutinante.(76)

Los animales afectados por una infección por VHE elaboran Ac detectables por inhibición de la hemaglutinación (IHA), SN, FC, ID e inmunofluorescencia (IF).-

Los Ac inhibidores de la hemaglutinación (Ac IHA) son detectados entre 1 y 2 semanas posteriores a la infección. Luego pueden ser detectados durante 6 meses en bajos títulos hasta que desaparecen.(111). Los animales que poseen alto título de Ac neutralizantes (Ac N) demuestran

una baja actividad IHA, siendo estos resultados independientes del tipo viral. (138)

Los Ac N alcanzan su título máximo a las 3 semanas post-infección, son detectados durante 4-5 meses y luego disminuyen el título hasta desaparecer en períodos de tiempo que oscilan desde 6 meses hasta 1 año. Los Ac N dependientes del complemento están directamente relacionados con la fase aguda de la enfermedad, con un título máximo a los 14 días post-infección mientras que los Ac N no dependientes del complemento son los que se detectan en el período de convalecencia y en títulos mucho más bajos. (77,122)

Los Ac fijadores de complemento (Ac FC) y los detectados por IF, se revelan a las 2 semanas post-infección, se ponen en evidencia durante 2 a 3 meses y luego desaparecen. (94). La reacción de FC, por lo tanto, es útil para detectar una infección reciente, ya que aproximadamente a los 90 días hay bajos títulos de Ac o desaparece la actividad fijadora del complemento. (14).

Los niveles de Ac N y detectados por IF posteriores a una reinfección, es decir los Ac secundarios, son hasta aproximadamente 4 veces más elevados que los niveles de Ac detectados luego de una primoinfección, mientras que el título de los Ac FC no varían. (94)

-P A T O G E N I A-

Tanto el VHE-1 como el VHE-4 penetran por la mucosa del tracto respiratorio superior, replican en el epitelio de la nasofaringe, tráquea y bronquios y luego pasan a los ganglios linfáticos regionales.-

El virus se aisla del exudado del tracto respiratorio durante 10-12 días a partir de iniciados los síntomas, aunque en equinos con enfermedad subclínica es recuperado durante un período de tiempo más corto. (2)

El VHE-1 posee además la propiedad de diseminarse en el organismo por vía sanguínea (viremia) entre el 3° y 5° día de iniciados los síntomas por lo que puede ser encontrado en el endotelio vascular y en leucocitos circulantes. (Figura N° 10).

En hembras infectadas por este tipo, se aisla virus del tracto respiratorio superior durante los 4 o 5 días posteriores a la infección y luego de la viremia es recuperado sólomente de leucocitos circulantes. En estas células podría permanecer, escaparía a la neutralización por Ac y llegaría al feto infectándolo, produciendo el aborto. (14,35,94). (Figura N° 11)

El virus se elimina por exudado nasal, saliva y posiblemente por heces durante el período agudo, siendo además abundante en los fetos abortados, líquidos y membranas fetales.-

Figura N° 10: AISLAMIENTO VIRAL Y TEMPERATURA EN EQUINOS INFECTADOS CON VIRUS HERPES EQUINO 1 Y 4 (Allen y Bryans 1986).

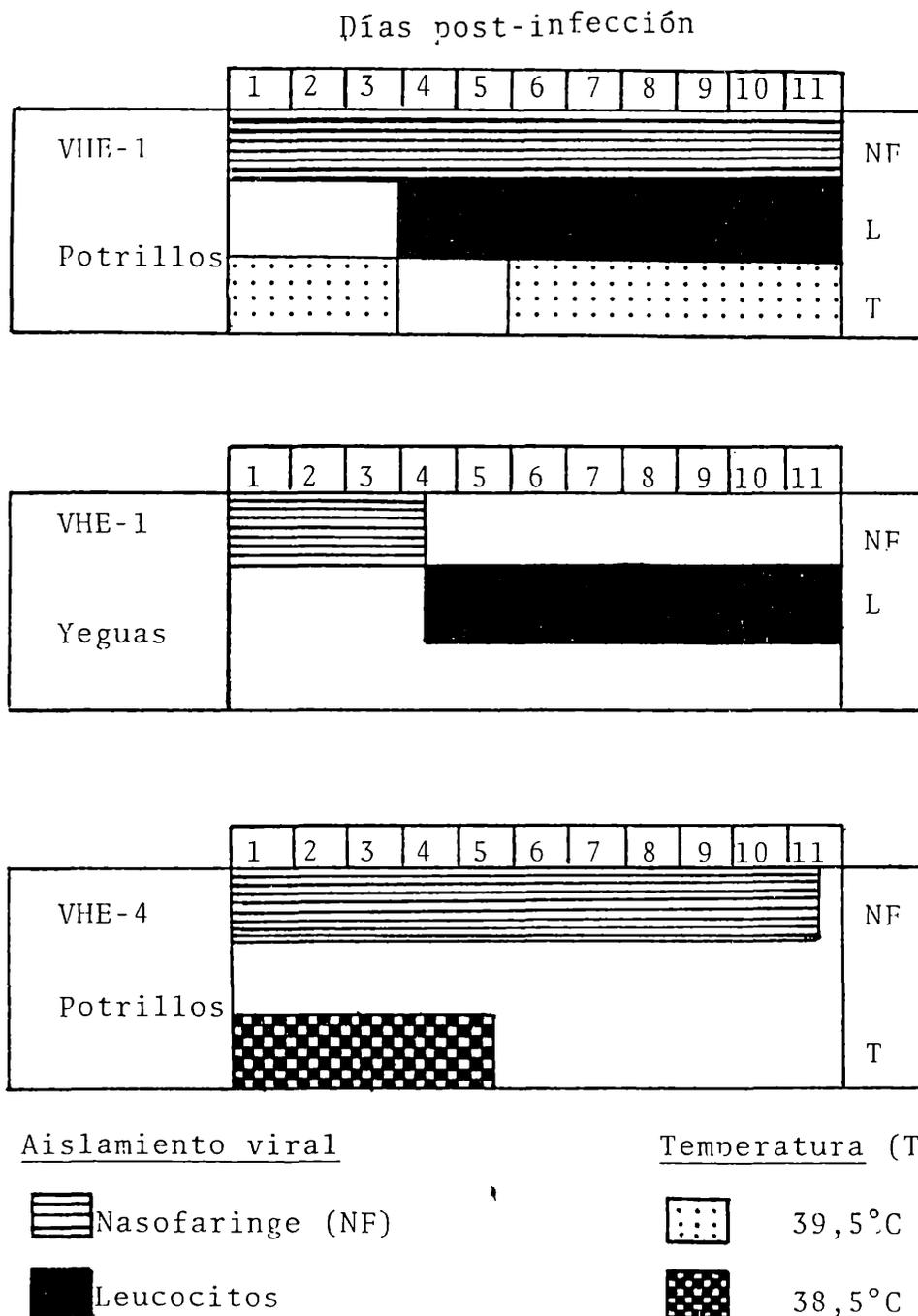
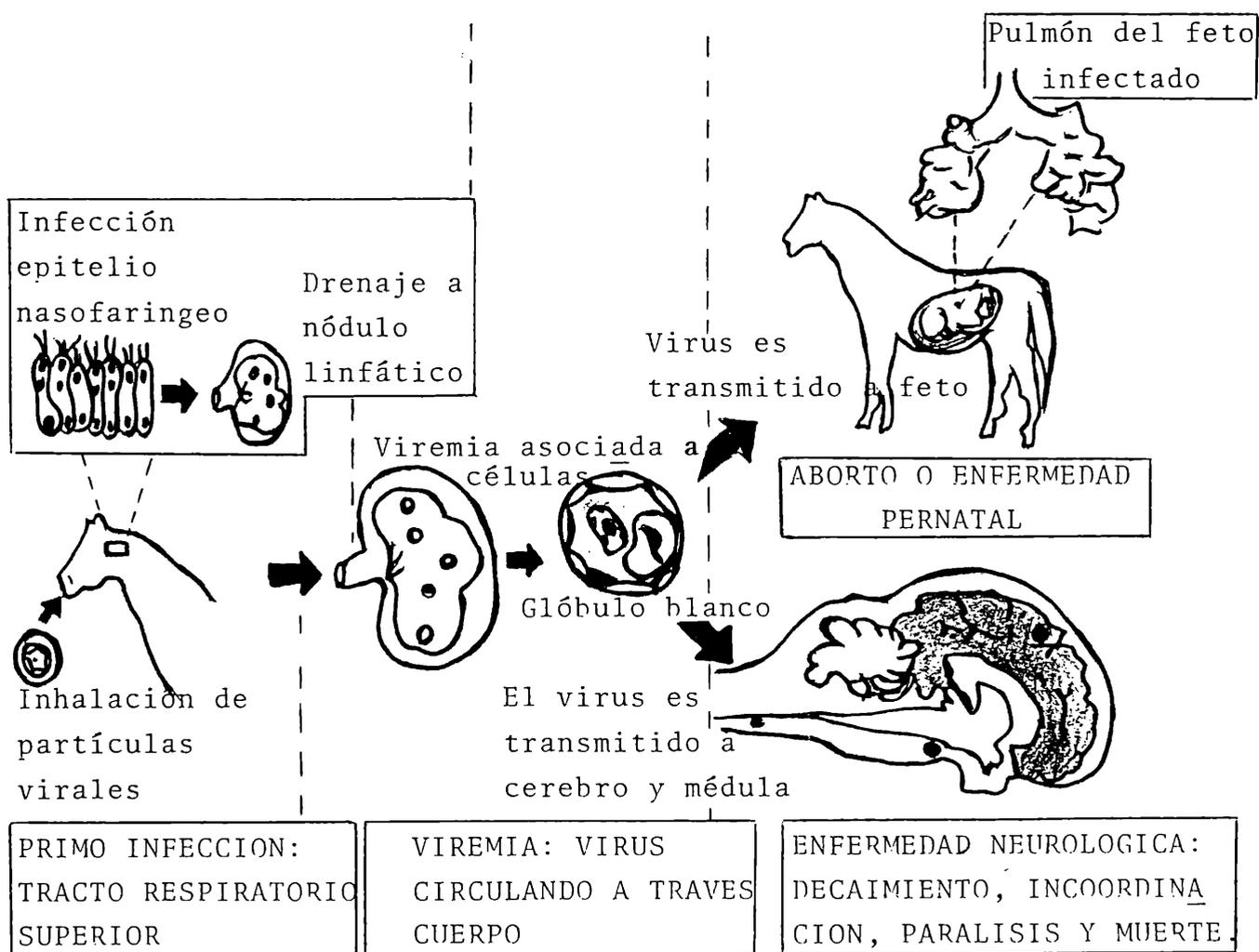


Figura N° 11: PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA INFECCION POR VIRUS HERPES EQUINO 1 (VHE-1). (Allen y Bryans 1986).



-SIGNOS CLINICOS Y LESIONES-

R I N O N E U M O N I T I S E Q U I N A . -

El período de incubación es de 2 a 10 días (94). El animal comienza con un cuadro de enfermedad respiratoria caracterizado por rinofaringitis y traqueobronquitis. Los síntomas duran aproximadamente 7 días, los animales presentan fiebre, tos, anorexia, depresión y descarga nasal serosa, la que puede hacerse mucosa y hasta mucopurulenta debido a infecciones asociadas. Se acompaña de congestión e hiperemia de la mucosa conjuntival. (43)

El cuadro producido por VHE-4 se caracteriza por ser más leve, acompañarse de fiebre moderada (38,9°C) y circunscribirse sólo al aparato respiratorio.(2)

En caso de que la infección sea por el VHE-1, se produce una curva difásica de la temperatura, la fiebre es más elevada (39,5°C) y el segundo pico febril coincide con la viremia (14). La infección es por lo tanto de tipo sistémico y la viremia se acompaña de neutropenia y linfopenia. (94)

Las complicaciones bacterianas secundarias son muy comunes pudiendo conducir a la formación de abscesos

en los ganglios linfáticos y en el tejido linfoide subepitelial de la faringe. Ocasionalmente se presentan bronconeumonías, las que pueden llegar a ser fatales. (100,111)

Las lesiones más relevantes consisten en necrosis del epitelio de las vías respiratorias y centros germinales linfoides, con inclusiones virales intranucleares. (21).

A B O R T O E Q U I N O . -

El aborto producido por VHE-1 es consecutivo al pasaje accidental del virus a través de la barrera placentaria, lo que estaría estrechamente relacionado con la viremia asociada con células a la que ya se hizo referencia en el punto correspondiente a la patogenia de esta viremia. -

Las yeguas pueden abortar entre los 15 y 120 días posteriores a la infección viral. (38).

El aborto sucede en forma súbita sin signos premonitorios y las membranas fetales permanecen intactas. (94).

Las lesiones encontradas en los fetos difieren según la edad de los mismos. Si el aborto ocurre con posterioridad al 7° mes, los fetos presentan ictericia, pete

quias en las mucosas, edema subcutáneo, edema pulmonar, esplenomegalia y cascotes teñidos de amarillo por el meconio.-

Microscópicamente se observa bronquiolitis, neumonitis, severa necrosis de la pulpa blanca esplénica y áreas de necrosis focal en hígado.-

En todos los casos, las lesiones se asocian con típicos cuerpos de inclusión virales. Sin embargo estos pueden desaparecer rápidamente como resultado de la fagocitosis o autólisis post-mortem. (21,133).

Los fetos abortados antes del 7° mes presentan severa autólisis con escasas inclusiones intranucleares y sin reacción inflamatoria. (111).

M U E R T E S P E R I N A T A L E S . -

Esta forma clínica debida a VHE-1 se presenta cuando el feto resulta infectado durante la última fase de la gestación, de manera que puede nacer vivo, dando lugar a dos posibles cuadros (2): algunos animales nacen presentando un severo estado de depresión que los lleva a la muerte dentro de las 24 horas de vida, mientras que en otros casos, nacen aparentemente normales e inmediatamente después muestran sintomatología respiratoria, muriendo en-

tre las 24 y 72 horas luego del nacimiento. (21).

Las lesiones observadas en este último tipo de manifestación clínica, consisten en pulmones voluminosos y firmes, con edema y congestión. El timo y ganglio linfáticos presentan tamaño normal y, en algunos casos, se observan lesiones necróticas en glándulas adrenales. Microscópicamente se observa alveolitis no supurativa, bronquitis y bronquiolitis necrotizante, encontrándose frecuentemente, inclusiones virales intranucleares en pulmón, timo y raramente en hígado. (34,82).

ENFERMEDAD NEUROLÓGICA.-

Este tipo de manifestación clínica fue relacionada por primera vez con VHE-1 en 1966 por Saxegaard, quien realizó el aislamiento del virus de tejido nervioso de equinos clínicamente afectados (117). Posteriormente fue comunicado en diversos países (2) como así también reproducido experimentalmente. (71).

El período de incubación es de aproximadamente 7 días (64) pudiendo enfermar animales de cualquier edad y dependiendo la sintomatología de la extensión y localización de las lesiones neuronales. (71).

Los signos que se observan varían desde una moderada ataxia e incoordinación hasta una parálisis completa de los miembros anteriores y posteriores con incontinencia urinaria.-

Las lesiones primarias en el Sistema nervioso central consisten en vasculitis, hemorragias focales y trombosis. (105). Los cambios necróticos observados, son en general poco extensos, de localización variable y se consideran secundarios a los cambios vasculares. (80,117)

-R E S P U E S T A I N M U N E-

La respuesta inmune de los equinos a una infección por VHE-1 es similar a la de otras especies infectadas por virus pertenecientes a esta familia.(2). El mecanismo es complejo y aún no está completamente dilucidado. Incluye una respuesta humoral, producción de Interferón y una respuesta de tipo celular.(103)

En potrillos, los Ac maternos transmitidos por el calostro, lo protegen de una infección natural, aproximadamente entre 4 y 6 meses. La inmunidad conferida por estos Ac está relacionada directamente a la cantidad de los mismos en el calostro y al volumen ingerido por el potrillo en las primeras 24 horas de vida. Esta inmunidad pasiva puede ser convertida en activa si el animal es expuesto a una infección por VHE-1 en el momento en que estos Ac calostrales están disminuyendo.(119).La infección natural del tracto respiratorio de los equinos es seguida por la aparición de Ac N y Ac FC pero la respuesta inmune resultante es de corta duración, disminuyen los títulos de Ac N de manera que los animales se tornan susceptibles nuevamente al virus entre los 4 y 5 meses posteriores a su recuperación.(94).

A pesar de la persistencia de Ac N la mucosa respiratoria puede ser reinfectada sucesivamente por el virus (35) y como consecuencia de estas infecciones múltiples no se

presentan síntomas clínicos de enfermedad respiratoria pero son posibles manifestaciones posteriores de enfermedad neurológica o abortiva. (2)

En el caso de las yeguas, los niveles de Ac circulantes contra VHE-1 no se correlacionan satisfactoriamente con el riesgo abortivo (103) de tal manera que hembras preñadas con altos niveles de Ac N y por lo tanto clínicamente protegidas pueden abortar un feto infectado (14,37). Cuando sucede el aborto, se registra una significativa reducción de los Ac N y Ac IHA mientras que los Ac FC pueden encontrarse en títulos elevados indicando una infección reciente. (138).

En relación a la respuesta inmune mediada por células, el rol de los mecanismos que intervienen no ha sido totalmente aclarado, si bien se sabe que pueden modificar la frecuencia de la enfermedad, la recuperación de los animales enfermos y, experimentalmente, inhibir la replicación viral in vitro. (2,103).

En el caso de hembras preñadas, el mecanismo por el cual el virus escapa a la neutralización por Ac durante su pasaje al feto, involucra una viremia materna "asociada con células". Bryans sugiere que el virus estaría localizado dentro de los macrófagos u otro tipo de leucocito y, estas células, estarían asociadas al transporte del virus y lo protegerían de la acción de los Ac. (14,91)

Pachiarz y colaboradores (103) midieron "in vitro" la respuesta inmune de origen celular cuantificando la

estimulación de los linfocitos con VHE-1, en hembras preñadas vacunadas y no vacunadas desafiadas con el virus; Estos autores determinaron una disminución en el recuento de glóbulos blancos, coincidente con la viremia, al 7° día del desafío. Además comprobaron bajos niveles de estimulación de leucocitos antes de la infección experimental en hembras que posteriormente abortaron. Luego del desafío hubo una depresión de la respuesta celular a la estimulación por el virus, al 7° día, coincidente con la viremia y la leucopenia; se produjo un "pico" a los 17 días que fue decreciendo entre los 21 y 68 días.-

La misma experiencia fue realizada en equipos jóvenes obteniéndose una respuesta similar pero con un máximo de estimulación a los 10 días, lo que demuestra un retardo en la respuesta en el caso de las yeguas gestantes. Corticoides y otros factores hormonales pueden contribuir a la inmunosupresión observada durante el último trimestre de la preñez, modificando el estado inmune general de los animales (103). Las yeguas abortan generalmente una sola vez lo que podría estar relacionado con alguna alteración cualitativa en la inmunidad mediada por células. (94)

Por lo tanto, no sólo la inmunidad mediada por Ac está involucrada en la protección contra infecciones producidas por VHE-1, sino que, en la resistencia a una re infección y en la prevención del aborto, se encuentran comprometidos mecanismos específicos y no específicos de la respuesta inmune, desempeñando un rol muy importante la inmunidad mediada por células. (30,43,60,63,65,136)

-EPIZOOTIOLOGIA-

El VHE produce infección clínica y subclínica en equinos que se encuentran en establecimientos de cría, centros deportivos y lugares de concentración. (11)

El contagio se produce por vía aerógena o por ingestión de alimentos contaminados (91). Ambos tipos virales producen enfermedad respiratoria, no pudiéndose diferenciar clínicamente cual es el virus actuante.-

En potrillos, la mayoría de las infecciones respiratorias se debe al VHE-4, mientras que el VHE-1 está relacionado con enfermedad de tipo sistémico y es el principal responsable de los abortos, muertes perinatales y síndromes neurológicos. (2,18,52)

La enfermedad respiratoria es común en potrillos al destete o cuando ingresan a centros hípicas, mientras que la infección subclínica se presenta en animales de distintas edades debido a reinfecciones sucesivas. (2)

Casi todos los equinos adultos presentan infecciones de tipo subclínico debido a la existencia de Inmunidad humoral y posiblemente Inmunidad mediada por células por exposiciones repetidas al virus. (94)

En todo los casos la mortalidad es baja y la morbilidad puede llegar hasta el 90%. (2)

Los abortos ocurren en mayor proporción entre el 7° y 11° mes de gestación. El 3% se presenta en el 7°

mes, el 10% en el 8° mes, el 29,5% en el 9° mes y el 55,5% entre el 10° y 11° mes. Sólo el 2% ocurre antes del 7° mes.-

Si bien pueden abortar varias yeguas, en el 70% de los establecimientos son comunes sólo 2 o 3 abortos por año y generalmente, relacionados a situaciones de estrés sufridas por las madres recién ingresadas y carentes de Ac (36,72).

La forma nerviosa afecta a varios animales, puede presentarse concomitantemente con abortos y es precedida generalmente de epizootias de enfermedad respiratoria. (94)

El fenómeno de latencia posee una significación epizootiológica esencial, principalmente en relación a la reactivación viral ya que asegura la transmisión silenciosa del virus a animales sensibles. (113,115)

Se ha demostrado que el VHE-1 es recuperado de las células blancas sanguíneas por lo que Bryans y colaboradores sugieren que estas células serían responsables también de la latencia del virus. De esta manera, sería transportado de una población equina a la otra conduciendo a nuevas manifestaciones (generalmente en caso de estrés) y subsecuentes abortos o síndromes neurológicos; quedando además disminuída las probabilidades de control por quimioterapia e inmunoterapia. (2,15,25)

-PREVENCIÓN Y CONTROL-

Cuando se presenta un brote de esta virosis es necesario el aislamiento de los animales infectados y la adopción/de medidas higiénicas para impedir la diseminación de la enfermedad.-

Los métodos actuales más efectivos para luchar contra estas afecciones, son los que pueden aplicarse en cada establecimiento en particular. Siendo el estrés, el factor predisponente en la presentación de epizootias, una profilaxis adecuada se obtiene con un manejo apropiado.-

Para evitar los abortos, las medidas más eficaces consisten en aplicar sistemas de cría en los que minimicen las oportunidades de estrés, practicando al mismo tiempo un programa sistemático de vacunación convenientemente planificado. (2,10,15).

La profilaxis, puede concentrarse además, en el control de la introducción de animales infectados en poblaciones libres de la enfermedad.-

Debido a la importancia del fenómeno de latencia, las medidas de control deberían tender, no sólo a prevenir las consecuencias clínicas, sino también la reactivación viral.-

Como la infección es adquirida por vía aerógena,

la mejor prevención debería consistir además, en proporcionar los medios que permitan estimular y mantener la calidad de la respuesta inmune que impidiera la infección o reinfección de la mucosa respiratoria. (13,37)

Toda forma de lucha contra la mayor parte de las enfermedades virales, depende en gran medida, del desarrollo de un método de vacunación seguro y efectivo. (15).

El primer ensayo de inmunización contra el virus fue realizado en Kentucky, en 1941 por Dimock y colaboradores, utilizando una vacuna elaborada a partir de hígado de feto equino. En 1952, Doll y colaboradores realizaron inmunizaciones con vacunas de tejidos de fetos naturalmente infectados, las que fueron posteriormente abandonadas porque producían ictericia hemolítica en el recién nacido. (86).

A partir de 1955, se recomendó el uso de vacunas a virus muerto, preparada con hígado de hamsters de Siria inoculados, aunque las mismas brindaban pobre protección y producían reacciones anafilácticas. (37,86)

Actualmente existen dos tipos de vacunas, a virus inactivado y a virus atenuado por pasajes en hamsters de Siria o por pasajes en cultivos de tejido (78,93,108).

Ambos tipos de vacunas se elaboran con VHE-1.-

Con respecto a las vacunas químicamente inactivadas, las mismas se elaboran con tejidos de fetos equinos infectados, y las vacunas a virus vivo modificado que

posee el mercado mundial, están desarrolladas sobre células de origen porcino y células de conejo. (15)

Las vacunas a virus inactivo son útiles para inmunoprofilaxis en áreas consideradas libres de enfermedad (85)

En trabajos experimentales realizados con este tipo de vacunas, se determinó una disminución del 50% de los abortos y se comprobó además que aquellos animales infectados experimentalmente y con alto título de Ac N, disminuyeron el tiempo de eliminación del virus. (13)

Es decir, que si el propósito de una vacuna consiste en prevenir la enfermedad, reducir la incidencia y la duración de los signos clínicos, como también el período de eliminación del virus, la vacuna inactivada cumple estos objetivos. (122). Pero si tenemos en cuenta que el VHE-1 produce viremia "asociada a célula", se puede inferir que estas vacunas no serían totalmente efectivas y, por lo tanto, el virus puede invadir al feto y producir el aborto. (104).

Considerando además la importancia (aún no aclarada totalmente), de la inmunidad mediada por células, evidentemente se debe tener en cuenta la posibilidad del uso de vacunas a virus vivo atenuado que producen una respuesta humoral y célular, similar a una infección natural lográndose así mejor protección. (75,108)

En experiencias realizadas con estas vacunas se observó una rápida respuesta de Ac N en animales adultos,

y la duración de los mismos fue similar a una infección natural. En cambio. en potrillos entre 3 y 7 meses de edad, la respuesta de Ac fue baja y de corta duración sugiriéndose que se debía a inmadurez del sistema inmune. Al ser desafiados con el virus, sólo 2 de estos animales con bajo título de Ac N desarrollaron enfermedad respiratoria, comprobándose además que estaban celularmente deprimidos, mientras que el resto de los animales con poco título de Ac N desarrollaron una alta respuesta celular.-

Otros autores no encontraron diferencias entre la respuesta humoral y celular en inoculaciones experimentales. (21).

Las vacunas atenuadas administradas intranasal, fueron utilizadas en áreas endémicas. Se observó disminución en el porcentaje de los abortos, en establecimientos individuales, pero no se redujo la incidencia de los mismos en el total de la poblaciones. Además pudo comprobarse que la atenuación no era muy eficaz ya que inoculada al feto lo afectaba directamente. (2,84,108)

Actualmente se descarta el uso de este tipo de vacunas atenuadas pues no se ha logrado una cepa libre de todo riesgo en cuanto a la eventual producción de aborto.-

Se considera que las vacunas atenuadas podrían llegar a utilizarse en zonas donde ya hubo exposición al virus (94) y en el caso de otros virus Herpes, estas vacunas son utilizadas cuando ya se produjo un brote y se inmunizan aquellos animales aún no infectados, de manera de

que toman contacto con el virus vacuna antes de que con el virus salvaje. (123)

De la misma forma que como sucede con las vacunas inactivadas, y como en otros Herpesvirus, el uso de las vacunas atenuadas no impide el posterior establecimiento del virus en forma latente. Mayr y colaboradores consideran que las vacunas atenuadas pueden producir interacción genética del virus con el genoma celular, lo que imposibilita el control de la enfermedad (85). Además podría esperarse también que hubiera interacción entre virus vacuna y virus salvaje. (104).

Se han realizado también, vacunas de subunidades con componentes del "envelope" y nucleocápside, purificados por ultracentrifugación y electroforesis en gel, comprobándose que sólo eran protectoras, aquellas realizadas con las fracciones glicoproteicas del "envelope". Igual que como ocurre con las vacunas inactivadas, las experiencias con este tipo de vacunas demostraron que sólo era estimulada una respuesta de tipo humoral no teniendo participación la respuesta celular que como se discutió anteriormente, debe ser considerada.-(21)

En Argentina, siguiendo los esquemas propuestos en otros países, se prefiere utilizar vacuna a virus inactivado.-

Los programas de vacunación consisten específicamente en inmunizar hembras preñadas y potrillos jóvenes para prevenir abortos y enfermedad respiratoria respectivamente.

te (13,20,27). Las crías que van a ser destetadas a los 6 meses de edad, reciben dos dosis de vacuna con 3 a 4 semanas de intervalo entre ellas y un refuerzo a los 6 meses de la segunda dosis. Las hembras preñadas reciben 3 dosis al 5°, 7° y 9° mes de gestación. En caso de tratarse de hembras preñadas recién arribadas al establecimiento, son vacunadas cada dos meses hasta el parto. El resto de los animales reciben una dosis antes de cualquier circunstancia que pueda producirles estrés o bien, previamente a la llegada de nuevos animales.-'

-OBJETIVO DEL TRABAJO-

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS A VHE-1 EN ALGUNAS POBLACIONES EQUINAS DEL PAIS POR MEDIO DE UN ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TECNICAS SEROLOGICAS.-

A) ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE SERONEUTRALIZACION PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA VHE-1.-

A-1: Puesta a punto de un sistema de cultivo celular apropiado para el desarrollo del VHE-1.-

A-1-1: Cultivo primarios de células de feto equino.-

A-1-2: Cultivos celulares de línea.-

A-1-3: Congelación de células.-

A-2: Multiplicación del VHE-1.-

A-2-1: Inoculación de cultivos celulares.-Control de la multiplicación viral.-

A-2-2: Titulación viral.-

A-3: Macrotécnica de Seroneutralización.-

A-4: Microtécnica de Seroneutralización.-

A-5: Seroneutralización bajo capa de agar.-

B) ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA VHE-1.-

B-1: Titulación del complemento y suero hemolítico.-

B-2: Titulación del Antígeno y el suero patrón.-

C) ESTUDIO SEROLOGICO.-

C-1: Recolección de muestras.-

C-2: Técnica de SN.-

C-3: Técnica de FC.-

C-4: Técnica de ID.-

D) ANALISIS DE LOS RESULTADOS.-

— — —

A) ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE SERONUETRALIZACION
PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA VHE-1.-A-1: PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO CELULAR
APROPIADO PARA EL DESARROLLO DEL VHE-1.-

MATERIALES Y METODOS:

CELULAS: Se realizaron cultivos primarios de células de fetos equinos obtenidos por cesárea de animales clínicamente sanos y de aproximadamente 7 meses de gestación.-

Además se utilizaron las líneas celulares MDBK (rinón, bovino) provenientes del American Type Culture Collection

(ATCC) y RK 13 (riñón de conejo) cedidas por el National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón.-

MEDIOS Y SOLUCIONES DE CULTIVO: Como medio de crecimiento celular (MC) se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM, Laboratorios Nissui, Japón) con 0,3% de caldo triptosa fosfato, 0,3 mg/ml de glutamina, 200 UI/ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se elevó el pH a 7,2 con bicarbonato de sodio al 7,5%.-

El medio de mantenimiento celular (MM) se preparó de la misma forma pero se redujo el SFB al 2%.-

Para la digestión de los tejidos se utilizó una solución de tripsina (Laboratorios Difco, USA) al 0,2% en solución tamponada de fosfatos (PBS).-

A-1-1: CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE FETO EQUINO.-

Los fetos fueron extraídos por cesárea con las envolturas fetales completas. En el laboratorio se sacaron en forma aséptica los siguientes órganos: riñones, pulmón, timo, hígado, testículos, glándula tiroidea y porciones de dermis de la zona del flanco y cara posterior de los miembros.-

Los riñones fueron decapsulados y posterior

mente se trituró el tejido cortical en fragmentos no mayores de tres milímetros. Se lavó dos veces con PBS, se colocó en frascos trébol con perlas de vidrio y cuatro partes de solución de tripsina, en agitación magnética por 20 minutos y a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y los restos de tejido fueron colocados nuevamente en solución de tripsina y en agitación magnética durante una hora a temperatura ambiente.-

Los pulmones, timo, hígado, testículos, glándula tiroides y dermis fueron triturados groseramente con tijera y colocados con perlas de vidrio y solución de tripsina en las mismas condiciones que las descritas para los riñones.-

Cada suspensión fue filtrada por gasa y centrifugada a 1.000 rpm 15 minutos; los sobrenadantes fueron eliminados y cada paquete celular se resuspendió en MC.
(118).

Se sembraron frascos Roux, frascos de 60 ml y tubos de 100 x 12 mm con una concentración de 1×10^6 células/ml.-

Se controlaron los cultivos cada 24 horas observándolos en microscopio invertido. Se renovó el MC cada 48 horas hasta la formación de una monocapa celular uniforme, reemplazando finalmente el MC por MM.-

A-1-2: CULTIVOS CELULARES DE LINEA.-

Monocapas confluentes de estas células fueron disgregadas con una solución formada por partes iguales de tripsina al 0,2% en PBS y de sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,2% en PBS. Posteriormente las células fueron lavadas con MC para eliminar restos de tripsina y se resuspendieron en el mismo medio para ser sembradas en una concentración de 3×10^5 células/ml en frascos Roux, frascos de 60 ml y tubos de 100 x 12 mm.-

Se sembraron además microplacas para cultivos celulares de 96 cavidades (Laboratorios Nunc, Dinamarca) con 100 ul de suspensión de células en concentraciones de 5×10^4 , 7×10^4 , 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$ y 2×10^5 células/ml. A cada pocillo se le agregaron 50 ul de MC de manera que el volumen final fue de 150 ul por cavidad. Se incubaron las placas a 37°C en atmósfera con 2% de CO₂.-

Los cultivos fueron controlados diariamente en microscopio invertido y cuando se formó una monocapa completa, el MC fue reemplazado por MM. El desarrollo de las células fue observado además con microscopio óptico previa fijación de laminillas con solución de Carnoy durante 15 minutos y tinción con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E).-

A-1-3: CONGELACION DE CELULAS.-

Monocapas confluentes de células de riñón y dermis equina y de línea RK 13 fueron disgregadas de acuerdo al método descrito en A-1-2. Posteriormente se resuspendieron en MC y se centrifugaron con el objeto de eliminar restos de tripsina. Parte del paquete celular fue resuspendido en MC con 12% de dimetilsulfóxido (DMSO, Laboratorios Merck, Argentina) y el resto se resuspendió en MC con 15% de glicerina pura (Laboratorios Merck, Argentina). La concentración de células fue de 2×10^6 células por , ml.-

Ambas suspensiones celulares fueron fraccionadas en ampollas de 2 ml, las que se sellaron y se colocaron 60 minutos a 4°C. Posteriormente se pasaron a -20°C durante 2 horas y finalmente se colocaron en termos de Nitrógeno líquido.-

Se sacaron muestras a las 24 horas, una semana, un mes, 3 meses y 6 meses para comprobar la viabilidad de las mismas.-

A-2: MULTIPLICACION DEL VHE-1.-

MATERIALES Y METODOS:

VIRUS: Se utilizó la cepa SP 1 de VHE-1 aislada en nuestro laboratorio en 1980 a partir de un feto equino abortado. (49).

CULTIVOS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO: Se usaron cultivos primarios de riñón (RFE) y dermis (DE) y la línea celular RK 13. Los métodos empleados y los medios y soluciones de cultivo utilizados para la realización de los cultivos fueron descritos en el punto A-1.-

A-2-1: INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES. CONTROL DE LA MULTIPLICACION VIRAL.-

Se inocularon monocapas celulares desarrolladas en tubos, frascos de 60 ml y frascos Roux con 0,1 , 0,5 y 1 ml de suspensión viral respectivamente. Se llevaron a 37°C durante una hora para favorecer la adsorción del virus, se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y finalmente se colocaron 1, 5 y 60 ml de MM respectivamente. Se dejaron tubos y frascos testigos reemplazando el inóculo por MM. (88).

Cada 24 horas se efectuó la observación de los tubos y frascos en microscopio invertido y se colorearon laminillas con H-E para observar la aparición y evolución del efecto citopatogénico (ECP) característico de este agente viral.-

Se realizaron diez pasajes del virus en RFE Y DE y, posteriormente, y empleando los mismos métodos, se adoptó el mismo a células de línea RK 13.-

A-2-2: TITULACION VIRAL.-

A-2-2-a: TITULACION EN TUBOS.-

Se realizaron diluciones de la suspensión viral en base 10 en MM (de 10^{-1} a 10^{-10}) y se inocularon mono capas completas de células RK 13 desarrolladas en tubos, por quintuplicado, con 0,1 ml de la dilución de virus correspondiente, como así también con material viral sin diluir. Se dejaron testigos sin inocular para ser utilizados como controles. Se llevaron los tubos a 37°C durante una hora, luego se retiró el inóculo, se lavaron las mono capas con PBS y posteriormente se agregó a cada tubo 1 ml de MM. Se incubaron a 37°C y se realizó el control cada 24 horas hasta el 6° día, en el que se efectuó la lectura final determinándose el título viral mediante el método de Reed y Muench. (92,118).

A-2-2-b: TITULACION EN MICROPLACAS.-

Se realizó la siembra de células y la inoculación del material viral en forma simultánea. Las diluciones virales se efectuaron en base 10 en MC (de 10^{-1} a 10^{-10}).-

Se cargaron los pocillos con 100 ul de una suspensión de células con una concentración de $1,5 \times 10^5$ células por ml y 50 ul de la dilución viral correspondiente. Se utilizaron cinco cavidades por cada dilución y se dejaron pocillos con virus sin diluir y controles en los que se reemplazó el inóculo por 50 ul de MC. Se incubaron las placas a 37°C y en atmósfera con 2% de CO_2 .-

Se controló diariamente y, a los 6 días, se analizó el resultado calculándose el título viral mediante el método de Reed y Muench.-

A-2-2-c: TITULACION POR EL METODO DE FORMACION
DE PLACAS DE LISIS BAJO AGAR.-

Se realizaron diluciones del material viral de acuerdo con el método descrito en A-2-2-a y se inocularon monocapas celulares completas con 0,2 ml de cada dilución viral y virus sin diluir, por duplicado. Se dejaron frascos controles sin inocular en los que se reemplazó el inóculo por MM.-

Posteriormente se llevaron a los frascos duran-

te una hora a 37°C, moviéndolos cada 10 minutos para favorecer la adsorción uniforme de las partículas virales. Se retiró el inóculo, se lavaron las monocapas con PBS y luego se cubrieron con medio de plaqueo (MP) manteniendo a 40-45°C en baño María y constituido por partes iguales de solución A y solución B:

Solución A: MEM 2X, 0,6% de caldo tritosa fosfato, 0,6 mg/ml de glutamina, 400 UI/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomycin y 4% de SFB. El pH se elevó a 7,2 mediante el agregado de bicarbonato de sodio al 7,5%.-

Solución B: Agar Noble (Laboratorio Difco, USA) al 3% en agua tridestilada.-

Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la solidificación del MP y luego se llevaron a 37°C en posición invertida. A los 6 días se removió el MP mediante el uso de formol tamponado al 10% y se colorearon las monocapas con solución cristal violeta al 10% en formol tamponado durante 10 minutos. Finalmente se desechó el colorante y se lavaron las monocapas con agua de canilla. Se realizó el conteo de las placas de lisis y se analizaron los resultados. (7,57,58,68,92).

A-3: MACROTECNICA DE SERONEUTRALIZACION.-

MATERIAL

CULTIVOS CELULARES: Se utilizaron células RK 13 desarrolladas en tubos de acuerdo con los métodos descritos en A-1-2.-

VIRUS: Se utilizaron 100 partículas infectivas/ml de una suspensión viral título 10^5 DICT₅₀/0,1 ml (Dosis infectante cultivo de tejido 50% por 0,1 ml).-

SUEROS CONTROLES: Se utilizaron dos sueros de referencia cedidos por el Dr. Mc Collum de la Universidad de Kentucky-USA:

- Suero equino positivo a VHE-1 y negativo al resto de las virosis equinas.-

- Suero equino negativo a VHE-1 y al resto de las virosis equinas.-

METODOS:

Se trabajó con el método virus constante-suero variable. (92,97).

Se mezclaron partes iguales de la suspensión viral y de diluciones en base 2 de los sueros MM a partir de la dilución 1/4 y hasta la dilución 1/2048; se llevaron a 37°C durante una hora para favorecer la unión Ag-Ac y, posteriormente, se inocularon monocapas celulares completas con 0,1 ml de cada una de las mezclas suero-virus, por cuadruplicado. Se dejaron controles de células en los que el inóculo

fue reemplazado por MM.-

Los tubos se llevaron a 37°C durante una hora para la adsorción de las partículas virales no neutralizadas y posteriormente se les agregó 1 ml de MM. Paralelamente, se efectuó otra titulación viral, para corroborar la utilización de la dilución correcta del virus.-

Se realizó la lectura final al 6° día, considerándose título neutralizante a la mayor dilución del suero que protegió al 100% de las unidades reveladoras.-

A-4: MICROTECNICA DE SERONUETRALIZACION.-

MATERIALES:

CELULAS: Se utilizaron células RK 13 en una concentración de $1,5 \times 10^5$ células/ml.-

VIRUS: Se usaron 100 partículas infectivas/50 ul de una suspensión viral de título 10^6 DICT₅₀ / 50 ul.-

SUEROS CONTROLES: Fueron citados en el punto A-3.-

METODOS:

A-4-1: Se realizó la mezcla suero-virus de acuerdo con los métodos desarrollados en A-3 pero reemplazando el MM

por MC. Posteriormente, se realizó la siembra de células y la inoculación de la mezcla suero-virus, tal como fuera descrito en A-2-2-b.-

Se utilizaron cuatro cavidades por cada dilución de suero, se dejaron cuatro controles sin inocular y se realizó una titulación paralela del virus. (92).

A los 6 días, se analizaron los resultados y se determinó el título neutralizante del suero de acuerdo con el método descrito en A-3.-

A-4-2: Se rotularon las microplacas de acuerdo a la forma indicada en la Figura N°12.

	C	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Suero											
Positivo											
Suero											
Negativo											

FIGURA N°12 : Microtécnica de Seroneutralización: Esquema seguido para la realización de la técnica.-

Se agregaron 50 ul de MC en los pocillos de la columna correspondiente al control de células (C), 25 ul en las cavidades correspondientes a las diluciones de suero de 1/8 a 1/2048 y 37,5 ul en la columna de la dilución 1/4. Posteriormente se colocaron 12,5 ul de suero en la columna rotulada 1/4 y con pipeta multicanal se homogeneizó y se diluyó en base dos hasta 1/2048. Luego se adicionaron 25 ul de la suspensión viral en todos los pocillos correspondientes a las diluciones de suero y se llevaron las placas a 37°C en atmósfera con 2% de CO₂ durante una hora, agitando cada 15 minutos para favorecer la neutralización del virus por los Ac. Finalmente se les agregó a todos los pocillos, 100 ul de la suspensión de células y se dejaron en incubación hasta el 6° día en que se determinó el título neutralizante de los sueros. En forma paralela se realizó una titulación del virus de acuerdo con el método descrito en A-2-2-b.-

A-5: SERONUETRALIZACION BAJO CAPA DE AGAR.-

MATERIALES:

CELULAS: Se utilizaron monocapas celulares RK 13 desarrolladas en frascos de 60 ml.-

VIRUS: Se usaron 100 UFP/ml (Unidades formadoras de placas/ml) de una suspensión viral de $9,5 \times 10^6$ UFP/ml).

MEZCLA SUERO-VIRUS: Se realizó de acuerdo al método descrito en A-3.-

MEDIO DE PLAQUEO (MP): Fue descrito en el punto A-2-2-c.-

METODOS:

Se utilizó el método desarrollado en A-2-2-c, pero para esta experiencia, la suspensión viral fue reemplazada por las mezclas suero-virus correspondientes. Se utilizaron dos frascos con monocapa completa por cada dilución de suero y se dejaron dos frascos controles de células inocular. Paralelamente se realizó una titulación del virus.-

La lectura final de los resultados se realizó a los 6 días. (7,57,68,89,92).

B) ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENT
TO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA VHE-1.-

B-1:TITULACION DEL COMPLEMENTO Y SUERO HEMOLITICO.-

MATERIALES:

GLOBULOS ROJOS OVINOS (GRO): Se obtuvieron por punción de la vena yugular de una oveja adulta clínicamente sana. La sangre se recogió con solución salina citratada (Alsever) y se mantuvo a 4°C. En el momento de ser utilizada se centrifugó a 1.000 rpm para eliminar la solución de Alsever y se lavaron los GRO tres veces con solución tampónada de veronal sódico con 0,1% de gelatina (STVS-G). Finalmente se preparó una suspensión de GRO al 4% en la misma solución tampón.-

SUERO HEMOLITICO (SH): Se utilizó suero de conejo anti-GRO de Laboratorios C. y J. Romaniello.-

MEZCLA HEMOLITICA (MH): Se mezclaron partes iguales de GRO al 4% y diluciones en base 2 a partir de la dilución 1/50 de SH. Se incubaron las mezclas durante una hora a 37°C y luego se llevaron a 4°C durante una noche.-

COMPLEMENTO: (C): Se obtuvo sangre por punción cardíaca

de cobayos adultos, se colocó a 37°C durante 30 minutos para su coagulación y luego se llevó a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó y el suero se fraccionó y se conservó a -70°C.-

METODOS:

Se prepararon diluciones de C: 1/20, 1/40, 1/50, 1/80, 1/100, 1/160, 1/200 y 1/320.-

En una policubeta de 96 pocillos de fondo en "U" (Laboratorios Corning) se colocaron 50 ul de STVS-g en cada cavidad y 75 ul en la hilera de control de GRO.-

En cada columna se agregaron 25 ul de cada dilución de C excepto en la hilera control de GRO; se llevó a 4°C durante una noche y al día siguiente se colocó a 37°C durante 15 minutos. Luego se agregaron 25 ul de MH en las hileras correspondientes a cada dilución y 25 ul de GRO al 2% en la hilera control de GRO. Se incubó a 37°C 30 minutos agitando cada 15 minutos y luego se llevó a 4°C para permitir la precipitación de los GRO en los pocillos donde no hubo hemólisis. (1,8).

La experiencia fue realizada por duplicado.-

D I L U C I O N D E C

<u>Dilución SH</u>	1/20	1/40	1/50	1/80	1/100	1/160	1/320
↓							
1/50							
1/100							
1/200							
1/400							
1/800							
1/1600							
1/3200							
GRO							

FIGURA N°13: Fijación de Complemento: Titulación del complemento y suero hemolítico: esquema seguido realización de la técnica.-

Se realizó la lectura de los resultados considerando una Unidad Hemolítica (UH) a la mayor dilución de SH que produjo 100% de hemólisis y una Unidad fijadora del complemento. (UFC) a la mayor dilución de C que con una UH produjo 100% de hemólisis. (1).

B-2: TITULACION DEL ANTIGENO Y SUERO PATRON.-

MATERIALES:

SUEROS CONTROLES (S): Fueron citados en el punto A-3.-

ANTIGENO (Ag): Se utilizó Ag elaborado con sobrenadante de cultivos celulares de línea RK 13 inoculados con la cepa SP 1 de VHE 1 y concentrado con 8% de Polietilenglicol 6.000.(99)

MEZCLA HEMOLITICA (MH): Se realizó de acuerdo al método descrito en B-1 y utilizando la dilución 1/1600 de SH correspondiente a 2 UH.-

COMPLEMENTO (C): Se usaron UFC correspondiente a la dilución 1/80. Se realizaron además diluciones para obtener 1 UFC y 1/4 UFC y ser utilizadas como controles.-

METODOS:

B-2-1: Se prepararon diluciones de Ag y S en base 2 desde la dilución 1/4 a 1/256. Las policubetas se rotularon de acuerdo a la forma indicada en Figura N° 14.

Dilución Ag ↓	Dilución de S							CC				
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/ 64	1/128	1/256	C _{Ag}	2U	1U	1/4U	CGRO
1/4												
1/8												
1/16												
1/32												
1/64												
1/128												
1/256												
CS												

FIGURA N° 14: Fijación de complemento: titulación del Antígeno y suero control: esquema seguido para / la realización de la técnica.-

Se llenaron las placas colocando 25 ul de STVS -G en los pocillos correspondientes a control de suero (CS) y control de Ag (C Ag), 50 ul en los de control de C y 75 ul en los de control de GRO (CGRO). Se agregaron 25 ul de cada dilución de Ag y S en las hileras y columnas correspondientes y en C_{Ag} y CS y 25 ul de C en todos los pocillos excepto en CGRO y en los controles de 1 UFC y 1/4 de UFC donde se agregaron 25 ul de las diluciones adecuadas. Se encubó a 4° C durante 18 horas, luego se colocó a 37°C durante 15 minutos y se agregaron a todas las cavidades 25 ul de MH, excepto en la columna CGRO donde se colocaron 25 ul de GRO 21 2%. Se incubó a 37° C duran-

te media hora para favorecer la unión Ag-Ac-C y finalmente se llevó a 4° C. La experiencia fue realizada por duplicado. (39,40,74,119).

Se efectuó la lectura final considerando como una Unidad antígenica (UAg) a la mayor dilución de Ag que no produjo hemólisis.-

B-2-2: Se realizó la experiencia diluyendo los sueros en la placa con microdiluidores desde la dilución 1/4 hasta 1/256 de acuerdo al método descrito en A-4-2, pero utilizando STVS-G como diluyente. Luego se agregaron 25 ul de Ag en las hileras correspondientes y se llevó a 37°C durante media hora; se colocaron 25 ul de la dilución de C en toda la placa excepto en CGRO y control de 1 UFC y 1/4 de UFC donde se reemplazó por la dilución apropiada. Se incubó nuevamente a 37°C durante media hora y, posteriormente, se agregaron a todos los pocillos 25 ul de MH excepto en CGRO donde se reemplazó la MH por GRO al 2%. Se dejó media hora a 37°C agitando cada 5 minutos y finalmente se centrifugó a 1.000 rpm para favorecer la precipitación de los GRO no hemolizados. Se realizó la lectura final de acuerdo a las consideraciones expuestas en el punto B-2-1. (1,92,97).

C: ESTUDIO SEROLOGICO.-

C-1: RECOLECCION DE MUESTRAS.-

Se formó un banco de sueros de equinos Sangre pura de carrera (SPC) proveniente de 3 haras de la Provincia de Buenos Aires y del Hipódromo de La Plata:

Haras N° 1 -----	42
Haras N° 2 -----	52
Haras N° 3 -----	91
Hipódromo de La Plata -----	96
TOTAL -----	280

Las muestras correspondientes a los haras N°1 y N° 2 pertenecen a animales que recibieron vacuna a virus inactivado contra VHE-1, 30 días antes de su extracción.-

El haras N°3 no utiliza vacunas contra VHE-1.-

Los sueros del Hipódromo de La Plata corresponden a animales provenientes de distintos puntos del país y pertenecen a las dos categorías: vacunados y no vacunados.-

Todos los sueros se conservan a -70°C y en el momento de ser utilizados fueron descomplementados a 60°C durante 30 minutos.-

C-2: TECNICA DE SERONEUTRALIZACION (SN).-

Se utilizó la técnica previamente estandarizada y descripta en A-4-2.-

Para el análisis de los sueros se rotularon las placas según la forma indicada en la Figura N°15 y se realizaron los correspondientes controles de título viral y sueros de referencia.-

	Control Células	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Suero 1								
Suero 2								
Suero 3								

FIGURA N° 15: Técnica de Seroneutralización: esquema seguido para el análisis de los sueros.-

C-3: TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO (FC).-

Se utilizó la técnica previamente estandarizada y descrita en B-2-2. Para el análisis de los sueros se emplearon 2 UAg, 2 UFC y 2 UH. y se rotularon las placas de acuerdo a la forma que se detalla en la Figura N°16. Se realizaron además, los controles correspondientes de suero de referencia, Ag, GRO y 2, 1 y 1/4 de UFC.

	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Control Suero
S1								
S2								
S3								
S4								
S5								
S6								
S7								
S8								
S9								
S10								
S11								
S12								

FIGURA N° 16: Técnica de Fijación de complemento: esquema seguido para el análisis de los sueros.-

C-4: TECNICA DE INMUNODIFUSION (ID).-

MATERIALES Y METODOS:

ANTIGENO (Ag): Fue citado en el punto B-2.-

SUEROS CONTROLES: Fueron descriptos en A-3.-

AGAR NOBLE (Laboratorios Difco): Se preparó al 0,8% en solución fisiológica (SF).-

La técnica se realizó de acuerdo con la metodología descrita en trabajos previos (99). Se cargaron placas de Petri de 6 cm. de diámetro con 6 ml de agar y, una vez solidificado, se practicaron perforaciones en forma de roseta con 6 orificios periféricos y uno central, de 3 mm de diámetro cada uno. Se sembraron 50 ul de suero en cada uno de los orificios periféricos y 50 ul de Ag en el orificio central se incubó a temperatura ambiente y se realizó la lectura final de los resultados a las 72 horas de la siembra.-

D: ANALISIS DE LOS RESULTADOS.-

Se determinó el porcentaje de animales positivos a VHE-1 por las técnicas de SN, FC e ID.-

Con el objeto de verificar la proporción de positivos encontrada y corroborar la homogeneidad entre las proporciones generales de las distintas muestras, se utilizó la Prueba de Chi cuadrado (χ^2 : ji cuadrado).-

Para determinar la intensidad de asociación entre los títulos de Ac SN y el número de positivos por SN, se determinó el Coeficiente de Correlación.-

-RESULTADOS-

A)

A-1: Los cultivos primarios de células de riñón y testículo formaron monocapas completas a los 5 días de la siembra; los cultivos de células de pulmón y timo demoraron 10 días y las células de dermis multiplicaron rápidamente obteniéndose una monocapa completa a las 48 horas. Las células de hígado y tiroides no se adhirieron al vidrio y por lo tanto el cultivo no prosperó.-

Los cultivos de riñón (RFE) y timo (TE) soportaron diez pasajes mientras que los de pulmón y testículo só lo pudieron tripsinarse cinco veces. Las células de dermis (DE) fueron tripsinadas entre quince y veinte veces.-

Los cultivos de línea MDKB y RK 13 fueron igualmente satisfactorios en cuanto a su desarrollo en tubos y frascos utilizando la concentración de 3×10^5 células por ml. En el caso de los cultivos en microplacas, se lograron monocapas uniformes al usar $1,5 \times 10^5$ células RK 13 por ml pero el desarrollo de las MDBK fue lento aún cuando se sembraron en concentraciones superiores.-

La coloración con H-E por 5 y 2 minutos respectivamente permitió observar nítidamente los detalles de núcleo y citoplasma celular (Fotos N° 1 y 4).-

Los dos métodos utilizados para la congelación de las células resultaron igualmente eficaces pudiéndose com-

probar que las mismas formaron monocapas luego de haber sido mantenidas como mínimo seis meses, posteriormente descongeladas y sembradas.-

A-2: La observación en microscopio invertido de los cultivos de RFE, DE y células RK 13 permitió notar cambios en las monocapas a partir de las 24 horas posteriores a la inoculación del virus. Estas manifestaciones consistieron principalmente en el redondeamiento y aumento del tamaño y de la refringencia celular, lisis y desprendimiento de las células del vidrio.-

Este efecto fue aumentando progresivamente para hacerse total entre las 72 y 96 horas posteriores a la inoculación. Con la coloración con H-E se observó la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares con marginación de la cromatina. (Fotos) N° 2, 3, 5 y 6).-

La titulación del virus en células RK 13 desarrolladas en tubos y microplacas fue analizado por el método de Reed y Muench obteniéndose un resultado de 10^5 DICT₅₀ 0,1 ml' y 10^6 DICT₅₀/ 50 ul respectivamente. Con el método de formación de placas de lisis bajo agar se obtuvo un título de $9,5 \times 10^6$ UFP/ml.-

A-3, 4 y 5: La técnica de SN en tubos, en microplacas y bajo capa de agar brindó resultados satisfactorios. El título de Ac N del suero de referencia positivo determinado por la SN en tubos y la microtécnica de SN fue de 1/64 y se corroboró la ausencia de Ac N contra VHE-1 en

el suero control negativo.-

B)

Se obtuvo un título de 1/160 para el C y de 1/1600 para el SH correspondiente a una UFC y una UH respectivamente.-

El Ag evaluado resultó óptimo y reaccionó específicamente con el suero de referencia fijando el C de manera que no se observó hemólisis al agregarse MH.-

La titulación del Ag y suero positivo control resultó de 1/64 y 1/8 respectivamente tanto cuando se utilizó la técnica lenta como cuando se realizó la técnica rápida.-

C)

- TECNICA DE SERONEUTRALIZACION:

Del total de 280 sueros analizados por esta técnica se encontraron 108 positivos y 171 negativos. (Tabla N°). Un suero proveniente del Hipódromo de La Plata no pudo ser estudiado por presentar contaminación micótica.-

Fueron considerados positivos aquellos sueros con título neutralizante a partir de la dilución 1/8.-

TABLA N° 4 : Resultados del análisis de sueros equinos por la técnica de SN para detección de Ac contra VHE-1.-

	Positivos	Negativos	TOTAL
Haras N° 1	28	14	42
Haras N° 2	33	19	52
Haras N° 3	24	66	90
Hipódromo	23	72	95
TOTAL	108	171	279

χ^2	Positivos	Negativos
Haras N°1	9	5,53
Haras N°2	8,45	5,28
Haras N°3	3,45 ^{NS}	2,2 ^{NS}
Hipódromo	5,29	3,37 ^{NS}

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

$$\chi^2 = 9 + 8,45 + 3,45 + 5,29 + 5,53 + 5,28 + 2,2 + 3,33$$

$$\chi^2 = 43,07 \text{ (3 gl)}$$

$p < 0,001 \dots$

... altamente significativo

.. muy significativo

· significativo

NS no significativo

Los títulos variaron entre 1/8 y 1/128 habiéndose encontrado los valores más altos en el Haras N°1. En los Haras N°2 y 3 el mayor valor de título de Ac N fue de 1/64 y 1/32 respectivamente mientras que en las muestras provenientes del Hipódromo de La Plata se obtuvo 1/16 como título máximo (Tablas N°5,6,7,8 y 9).

TABLA N°5: Número de sueros positivos a VHE-1 por la técnica de SN clasificados por títulos de Ac N.-

	Título de Ac Neutralizante					Total
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
HARAS N° 1	5/42	7/42	12/42	2/42	2/42	28/42
HARAS N° 2	14/52	11/52	6/52	2/52	0/52	33/52
HARAS N° 3	18/90	2/90	4/90	0/90	0/90	24/90
HIPODROMO	19/95	4/95	0/95	0/95	0/95	23/95
TOTAL	56/279	24/279	22/279	4/279	2/279	108/279

TABLA N°6: Porcentaje de sueros positivos a VHE-1 por la técnica de SN (clasificados por títulos y por orden etario). (HARAS N°1).

	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Total
hasta 6 m.	14.28	28.56	28.56	0	0	71.40
6 m.a 1 año	14.28	28.56	14.28	0	0	57.12
2 años	0	20.00	0	0	0	20.00
4 años	0	50.00	0	0	0	50.00
5 a 10 años	20.00	0	60.00	20.00	0	100
11 a 15 años	50.00	0	50.00	0	0	100
+ de 15 años	7.69	7.69	38.45	7.69	15.38	76.90

TABLA N° 7 : Porcentaje de sueros positivos a VHE-1 por la técnica de SN (clasificados por títulos y por orden etario). (HARAS N°2).-

	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Total
hasta 6 m.	14.28	42.86	0	0	0	57.14
6 m. a 1 año	42.86	14.28	0	0	0	57.14
2 años	60.00	0	0	0	0	60.00
4 años	0	50.00	0	0	0	50.00
5 a 10 años	12.50	50.00	12.50	0	0	75.00
11 a 15 años	37.50	12.50	25.00	12.50	0	87.50
+ de 15 años	28.13	9.37	28.13	9.37	0	75.00

TABLA N° 8 : Porcentaje de sueros positivos a VHE-1 por la técnica de SN (clasificados por títulos y por orden etario). (HARAS N°3).-

	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Total
hasta 6 m.	0	0	0	0	0	0
6 m. a 1 año	33.30	0	0	0	0	33.30
2 años	34.78	0	0	0	0	34.78
4 años	40.00	0	0	0	0	40.00
5 a 10 años	7.40	3.70	7.40	0	0	18.50
+ de 11 años	33.30	8.30	16.60	0	0	58.20

TABLA N° 9 : Porcentaje de sueros positivos a VHE-1 por la técnica de SN (clasificados por títulos y por orden etario. (Hipódromo de La Plata).-

	1/8	1/16	1/32	1/64	TOTAL
2 años	21.65	4.35	0	0	26.00
3 años	19.00	0	0	0	19.00
4 años	27.75	5.55	0	0	33.30
5 años	23.52	5.88	0	0	29.40
6 años y +	8.33	0	0	0	8.33

TABLA N° 10 : Correlación entre número de positivos por seroneutralización y títulos de Ac N.

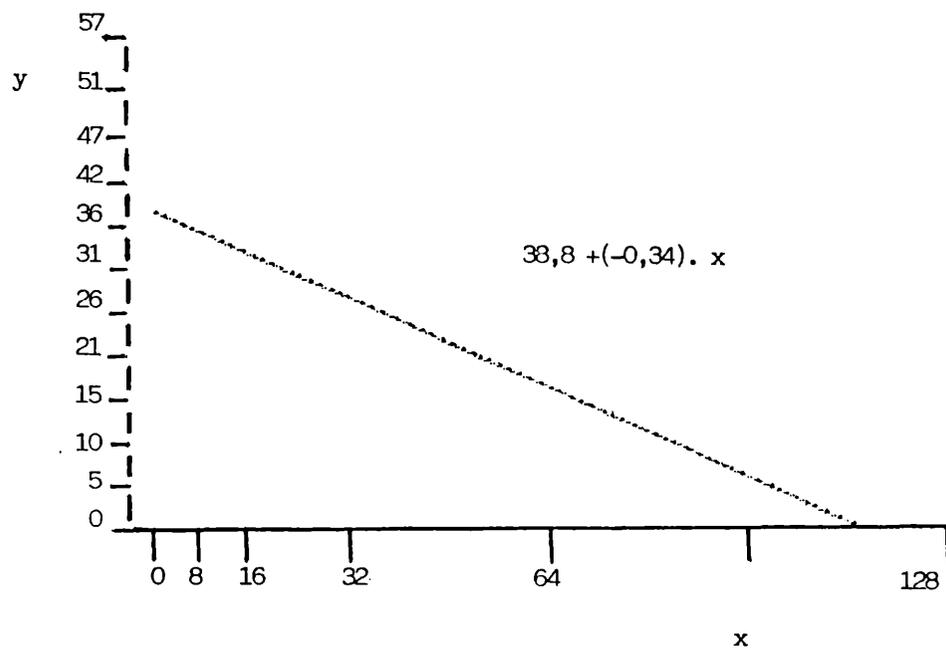
	CORRELACION
HARAS N°1	- 0,57
HARAS N°2	- 0,89
HARAS N°3	- 0,60
HIPODROMO	- 0,57
GENERAL	- 0,78

Se observó una asociación, variable en intensidad entre el número de sueros positivos y los títulos de Ac N hallados, en los distintos establecimientos.-

En general la asociación es inversa es decir que a mayor título de Ac N se encontró menor fuerza de asociación. (Gráfico N° 1).

En animales preñados se observó que las hembras vacunadas mostraron diferencias de títulos de Ac N con respecto a las aún no vacunadas sólo en el Haras N°1. En el Haras N°2 los títulos fueron similares. (Gráfico N° 2)

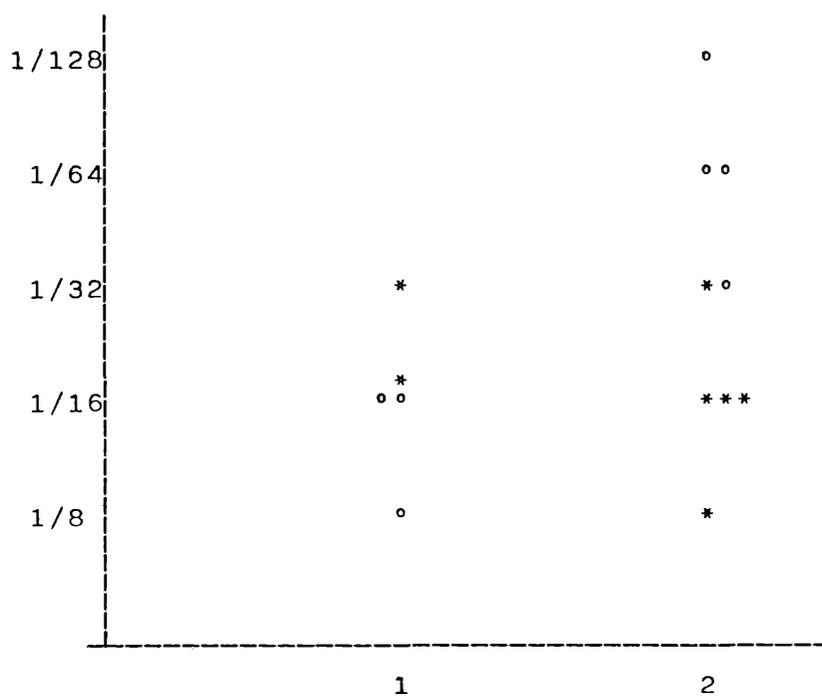
Gráfico N° 1: Asociación entre número de positivos detectados por SN y títulos de Ac neutralizantes.



x: inversa de título de Ac N.

y: número de positivos por SN

Gráfico N° 2: .Comparación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1, en yeguas preñadas vacunadas y no vacunadas en establecimientos de cría.



1- yeguas preñadas no vacunadas

2- yeguas preñadas vacunadas

° Haras N° 1

* Haras N° 2

-TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO:

Se consideraron positivos los sueros con título 1/4 en adelante.-

Del total de las 280 muestras analizadas, 19 resultaron positivas (Tabla N° 11) de las cuales 17 poseían título 1/4 y sólo dos sueros pertenecientes a los Haras n°1 y 3 tenían título 1/8.-

TABLA N° 11: Resultados del análisis de sueros equinos por la técnica de FC para detección de Ac contra VHE-1.-

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
HARAS N°1	5	37	42
HARAS N°2	7	45	52
HARAS N°3	5	85	90
HIPODROMO	2	94	96
TOTAL	19	261	280

χ^2	POSITIVOS	NEGATIVOS
HARAS N°1	1,33 ^{NS}	0,10 ^{NS}
HARAS N°2	2,25 ^{NS}	0,18 ^{NS}
HARAS N°3	0,16 ^{NS}	0,01 ^{NS}
HIPODROMO	2,66 ^{NS}	0,17 ^{NS}

$$X^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

$$X^2 = 1,33 + 2,25 + 0,16 + 2,66 + 0,10 + 0,18 + 0,01 + 0,17$$

$$X^2 = 6,8 \text{ (3gl)}$$

$p > 0,05 < 0,1$	NS
------------------	----

NS= No significativo.-

-TECNICA DE INMUNODIFUSION-

Por esta técnica se encontraron 52 sueros positivos (Tabla N° 12 y 13).

Sólo produjeron línea neta de precipitación aquellos sueros con título de Ac N de 1/16 o superior excepto un suero que con título de 1/16 resultó negativo por ID (Gráfico N° 3)

Gráfico N° 3: Comparación entre anticuerpos detectados por Inmunodifusión y títulos de anticuerpos neutralizantes.

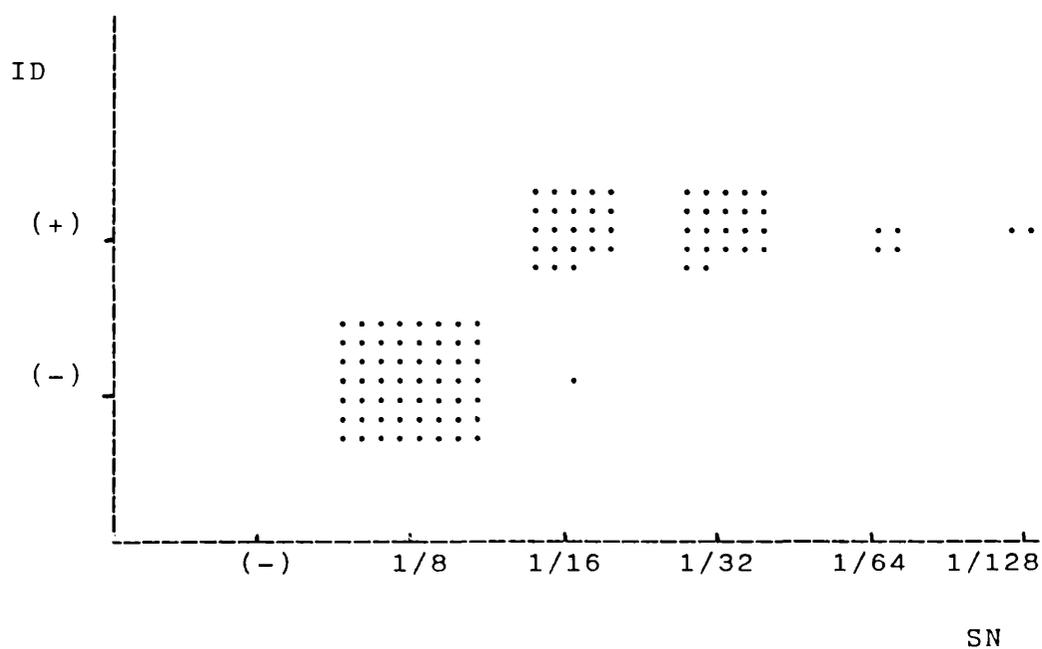


TABLA N° 12: Resultados del análisis de sueros equinos por la técnica de ID para detección de Ac contra VHE-1.-

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
HARAS N°1	23	19	42
HARAS N°2	18	34	52
HARAS N°3	6	84	90
HIPODROMO	5	91	96
TOTAL	52	228	280

χ^2	POSITIVOS	NEGATIVOS
HARAS N°1	28,15 ..	6,6 ..
HARAS N°2	6,4 ..	1,52 NS
HARAS N°3	7,11 ..	1,65 NS
HIPODROMO	9,38 ..	2,16 NS

$$\chi^2 = \sum_E \frac{(O-E)^2}{E}$$

$$\chi^2 = 28,15 + 6,4 + 7,11 + 9,38 + 6,6 + 1,52 + 1,65 + 2,16$$

$$\chi^2 = 63 \text{ (3gl)}$$

$p < 0,001 \dots$

... altamente significativo

.. muy significativo

NS no significativo

TABLA N° 13: Comparación entre anticuerpos detectados por Inmunodifusión y anticuerpos detectados por Seroneutralización.-

	ID POSITIVOS	ID NEGATIVOS	TOTAL
SN POSITIVOS	51	57	108
SN NEGATIVOS	0	171	171
TOTAL	51	228	279

TABLA N° 14: Comparación de los porcentajes de positivos obtenidos por SN, ID y FC en los distintos establecimientos estudiados.-

	SN (%)	ID (%)	FC (%)
HARAS N° 1	66,6	54,7	11,9
HARAS N° 2	63,4	34,6	13,4
HARAS N° 3	26,6	6,6	5,5
HIPODROMO	23,9	5,2	2,0

El estudio comparativo de los resultados obtenidos por las tres técnicas empleadas determinó que de un total de 280 sueros, el 18,57% de los reactores fue detectado por ID, 38,57% por SN y 6,78% por FC,

(Gráfico n° 4)

Gráfico N° 4: Porcentaje de animales positivos a VHE-1 por las técnicas de Inmunodifusión, Seroneutralización y Fijación de Complemento.

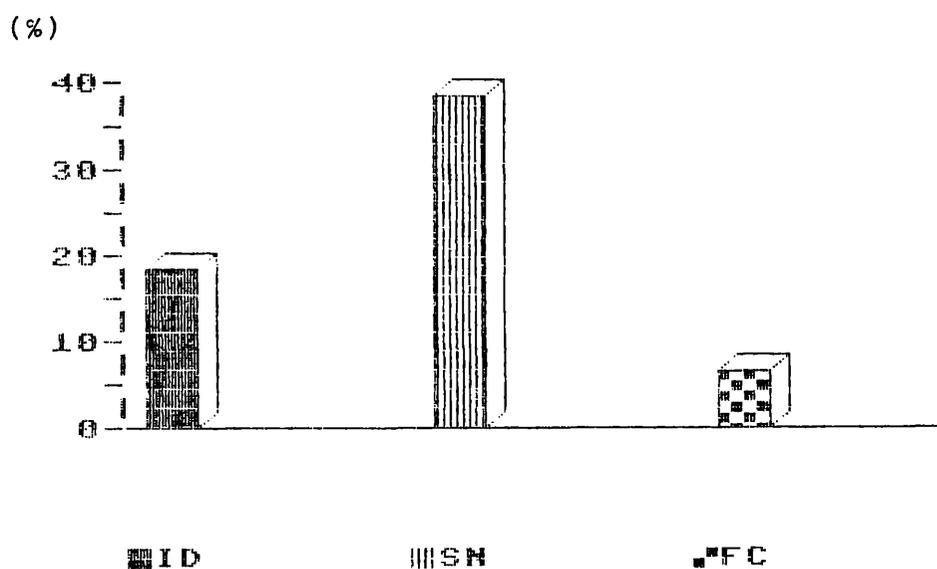
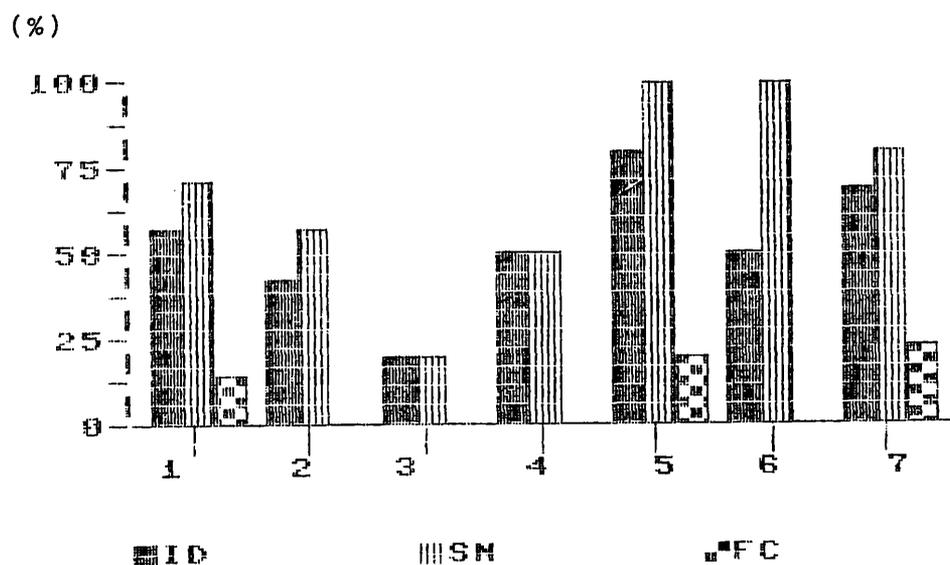


Gráfico N° 5 : Porcentajes de animales de cría (Haras N° 1) positivos a VHE-1 por las técnicas de Inmuno difusión, Seroneutralización y Fijación de Complemento (clasificados por orden etario).



- 1- hasta 6 meses de edad
- 2- de 6 meses hasta un año
- 3- 2 años
- 4- 4 años
- 5- de 5 a 10 años
- 6- de 11 a 15 años
- 7- más de 15 años

Gráfico N° 6: Porcentaje de animales de cría (Haras N° 2) positivos a VHE-1 por las técnicas de Inmuno difusión, Seroneutralización y Fijación de Complemento (clasificados por orden etario).

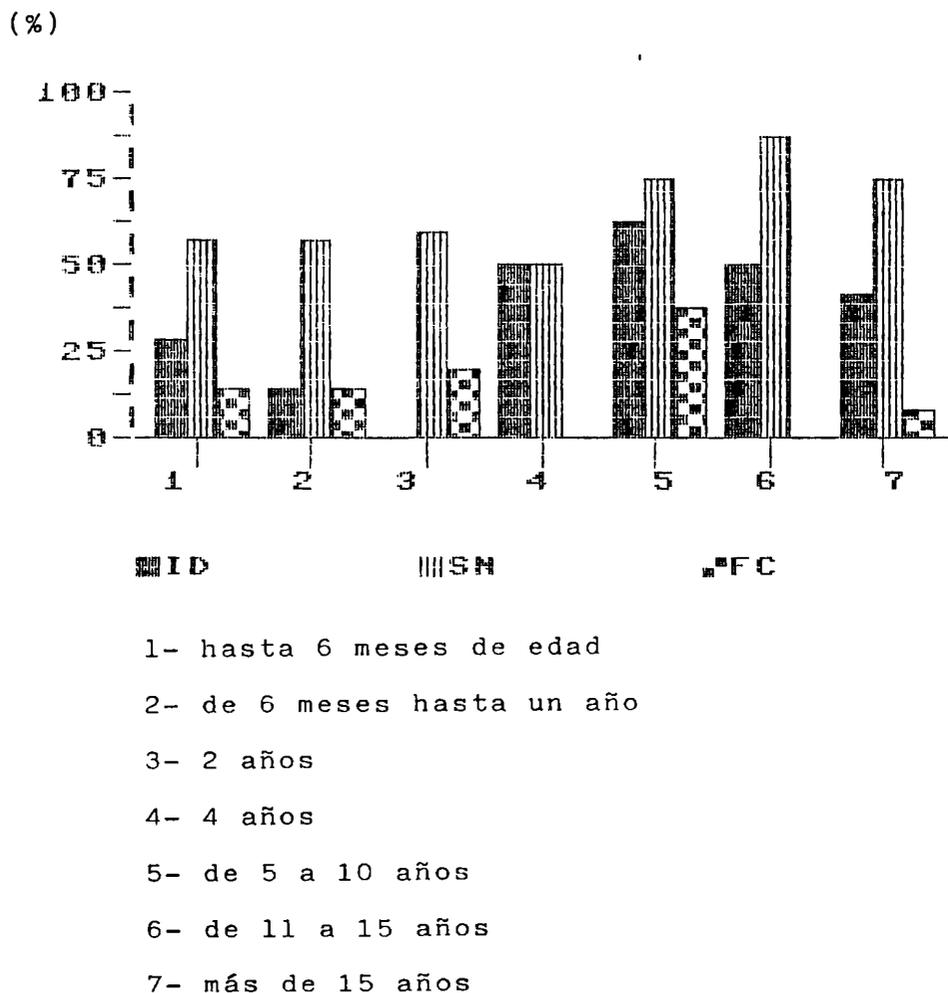
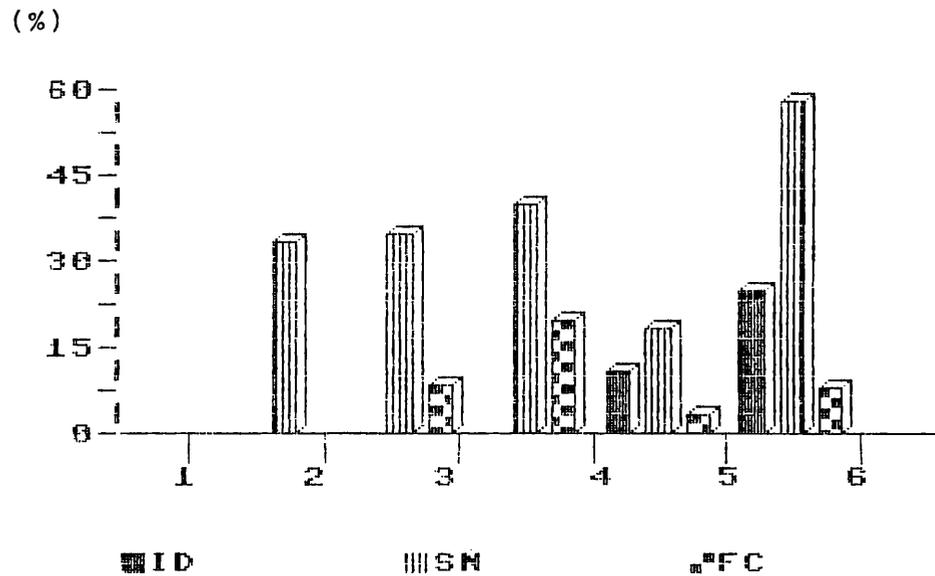
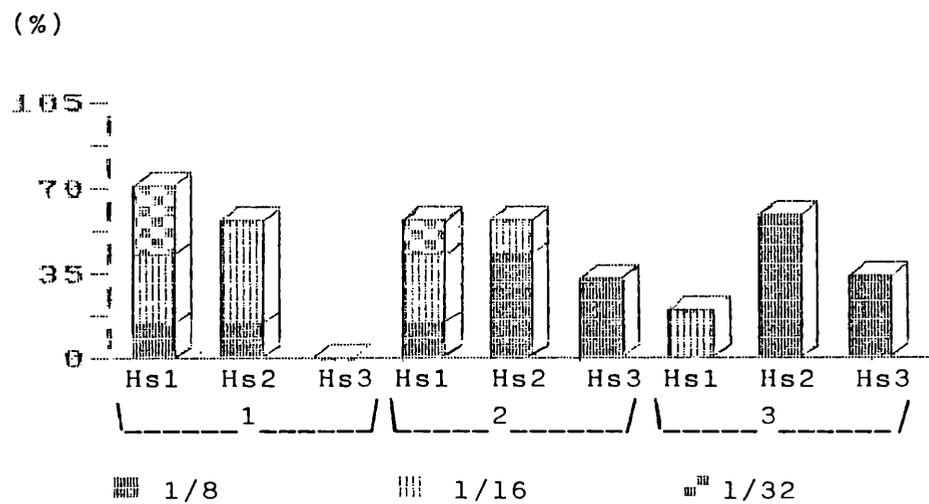


Gráfico N° 7: Porcentaje de animales de cría (Haras N° 3) positivos a VHE-1 por las técnicas de Inmuno difusión, Seroneutralización y Fijación de Complemento (clasificados por orden etario).



- 1- hasta 6 meses de edad
- 2- de 6 meses hasta un año
- 3- 2 años
- 4- 4 años
- 5- de 5 a 10 años
- 6- 11 años y más edad

Gráfico N° 8: Porcentaje de títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1 en animales de cría (clasificados por orden etario).



1- hasta 6 meses de edad

2- de 6 meses hasta un año

3- 2 años

Gráfico N° 9: Porcentaje de títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1 en animales de cría (clasificados por orden etario).

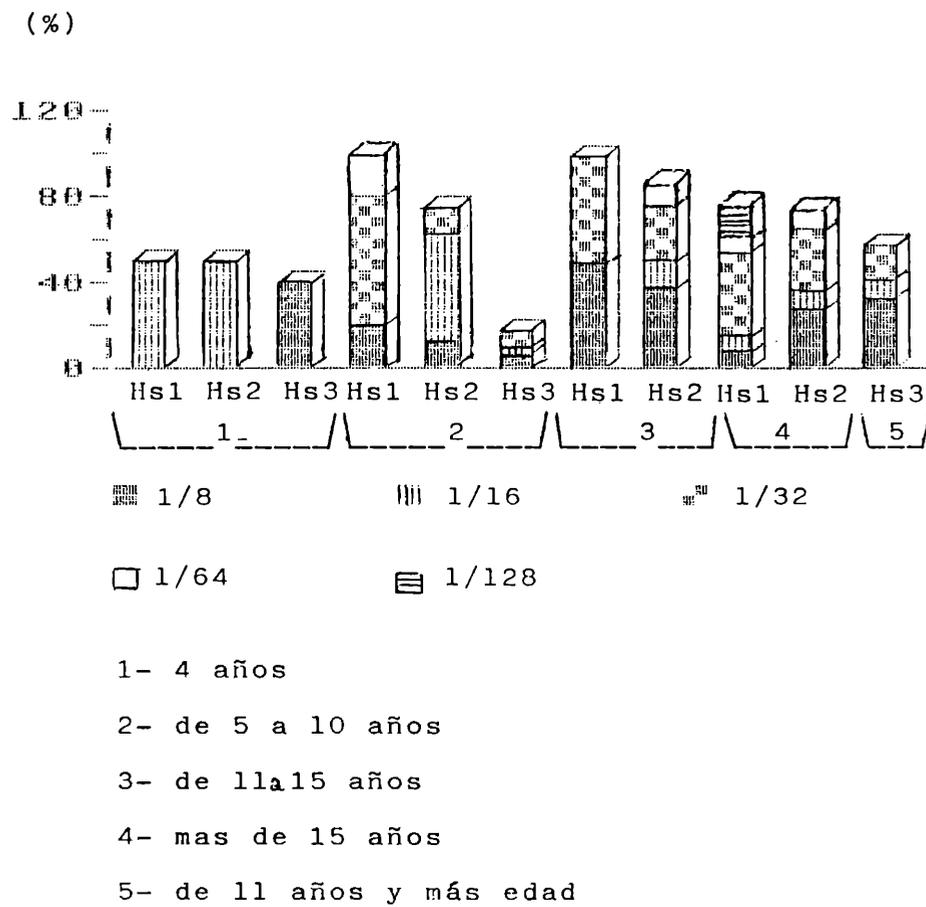
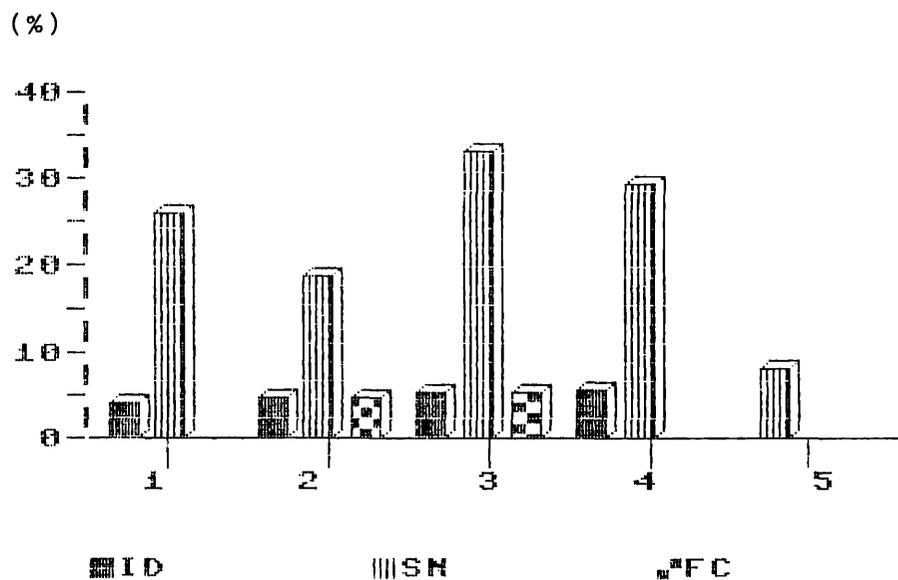


Gráfico N° 10: Porcentaje de animales en entrenamiento
(Hipódromo de La Plata) positivos a VHE-1
por las técnicas de Inmunodifusión, Sero-
neutralización y Fijación de Complemento.
(clasificados por orden etario)



1- 2 años

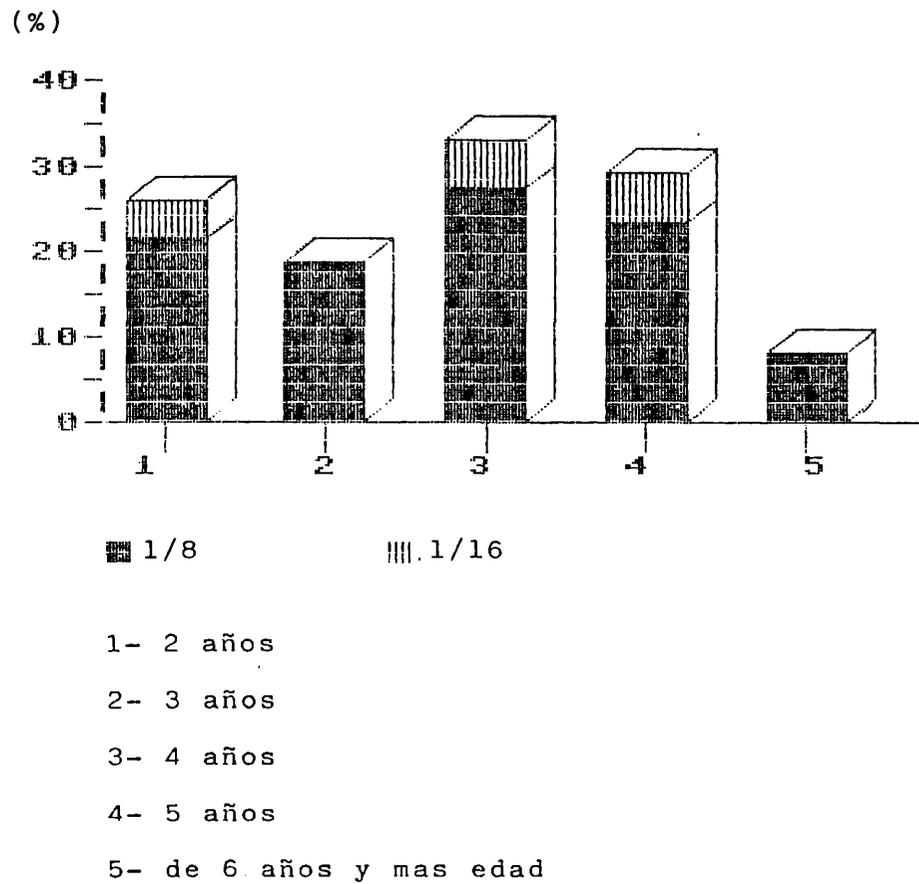
2- 3 años

3- 4 años

4- 5 años

5- de 6 años y más edad

Gráfico N°11: Porcentaje de títulos de anticuerpos neutra_lizantes contra VHE-1 en animales en entrenamiento (clasificados por orden etario).



-DISCUSION-

Debido a que el VHE-1 tiene un amplio espectro de células susceptibles para su replicación existen varios sustratos celulares que pueden ser utilizados para su cultivo "in vitro", habiendo optado en este trabajo por la línea RK 13. (2,6,17,19,75,78,102).

La técnica de SN se estandarizó inicialmente en tubos y bajo capa de agar, pero para el análisis rutinario de todas las muestras, se utilizó la microtécnica en placa que ofrece ventajas de practicidad y economía.-

Es sabido que el complemento favorece la neutralización para muchos virus, pero los estudios "in vitro" realizados con VHE sugieren que sólo interviene en la neutralización de los Ac tempranos relacionados con la Ig M (23,65). Fenner y colaboradores (52) también lo señalan afirmando que posteriormente no es necesario, no obstante aumentar la sensibilidad de la técnica.-

Yoshino y colaboradores (122) confirmaron que la neutralización dependiente del complemento es de valor diagnóstico en una infección primaria, no ocurriendo lo mismo en respuesta a sucesivas infecciones o reactivaciones. (65)

Por otra parte, Wallis y Melnick (132) sostienen que el complemento acelera la neutralización pero no incrementa el índice de neutralización final, contrariamen-

te a lo señalado por Fenner y colaboradores.-

En el presente trabajo, no se utilizó complemento, aunque con el mismo podrían haberse detectado títulos más elevados en la respuesta temprana al estímulo antigénico.-

La técnica FC fue desarrollada de acuerdo a trabajos descritos por otros autores (39, 40) pero a diferencia de éstos, que elaboraron el Ag a partir de órganos de fetos equinos infectados, en este trabajo se determinó que el Ag obtenido a partir de cultivos celulares infectados y utilizado en la ID, también resultó apropiado para su uso en esta técnica.-

La prueba ID fue realizada de acuerdo a lo descrito en trabajos realizados en este laboratorio (99), pero el Ag utilizado fue de mayor sensibilidad ya que permitió detectar por ID aquellos sueros con título de Ac N 1/16 en adelante.-

Para el análisis de los resultados del estudio serológico, debemos considerar que refiriéndonos a SN, los valores obtenidos en los distintos laboratorios no son estrictamente extrapolables en cuanto a la determinación del título mínimo de Ac N que brinda protección (14, 63). Bryans (10) sugiere que títulos de Ac N de 1/8 o mayores se correlacionan con resistencia de los animales a una infección experimental. Sin embargo, Burrows y Goodridge (19) demuestran esta correlación con títulos mayores de 1/25. Así también Gleeson y Coogins encontraron

que hembras preñadas con títulos de Ac N menores de 1/16 no fueron protegidas contra una infección experimental. (63).

En la presente experiencia se tomó la dilución 1/8 de los sueros a partir de la cual los animales fueron considerados positivos a VHE-1. Quedaría aún por determinar en estudios posteriores si este valor es protector o no.-

Si comparamos SN con ID (Gráfico N°3) observamos que son positivos por ID aquellos animales con título de Ac N de 1/16 o mayores escapando a la sensibilidad de la misma los sueros con título 1/8 que, por lo descrito anteriormente, los consideramos de valor diagnóstico (Tabla N°13).-

De acuerdo a la dinámica de los Ac Fc, que son revelados a las 2 semanas pi y se evidencian por 2 meses hasta desaparecer alrededor de los 3 meses pi, Doll y Bryans (39) determinaron que títulos de Ac FC de 1/8 o menores indican una infección ocurrida como mínimo 2 meses atrás, mientras que los títulos de 1/16 o mayores se relacionan a una infección más reciente. Estas conclusiones se deben relacionar también a la dinámica de Ac N.-

Nosotros hallamos que el 89,5% de los reactores por FC poseen título de 1/4 y sólo 1,5% de 1/8 por lo que podemos inferir que aproximadamente en los 60 días anteriores al muestreo la mayoría de los equinos no habían recibido estímulo antigénico.-

Además por el análisis por la prueba del "chi cuadrado", observamos que en los establecimientos estudiados, el porcentaje de positivos hallados no es significativo. (Tabla N°11).-

Esto es coherente con el hecho de que los Ac FC persisten poco tiempo y por lo tanto, al tomar las muestras a distintas edades, los resultados no son comparables entre los distintos establecimientos.-

En la actualización bibliográfica realizada sobre esta virosis, no se obtuvo información respecto a la posible variación en la intensidad y durabilidad de Ac FC como respuesta a sucesivos estímulos antigénicos por vacuna a virus inactivado.-

En el muestreo realizado debemos considerar que tanto los animales de los establecimientos de cría como los del Hipódromo se encuentran bajo estricto control sanitario, con planes de vacunación (en los casos en que se realiza) de acuerdo a los esquemas actualmente en uso en otros países. (13,20,27).

Es sabido que los fetos equinos no reciben Ac maternas por vía transplacentaria, la inmunidad pasiva es debida sólo a los Ac calostrales (21) y Fu y colaboradores (54) sostienen que luego de haber mamado el calostro, los sueros de los potrillos poseen igual nivel de Ac N que sus madres. Estos Ac no son detectables a los 180 días de edad (124) si bien algunos autores sostienen que ya a los 100 días están ausentes y que sólo son protectores hacia una infección por el virus durante

3 semanas a partir de su ingestión. (3,26,84,90)

Considerando por lo antedicho que el mayor riesgo de infección de los potrillos es a partir de los 3 meses de edad y teniendo en cuenta que el inmunógeno vacunal dado en forma demasiado temprana puede ser neutralizado por los Ac calostrales, el esquema de vacunación contempla comenzar a vacunar entre los 100 y 120 días de edad. (13)

Sin embargo, y como es de esperar, Dutta y colaboradores (45) consideran que la capacidad de los potrillos de responder activamente a la vacunación es independiente de la ingestión previa del calostro, siempre y cuando se tuviera en cuenta lo anteriormente señalado en relación a la probable neutralización por Ac pasivos. (90,112)

Studdert sugiere que el estado inmunitario pasivo se transforma en activo si el potrillo es expuesto al virus en el momento que disminuye el título de Ac calostrales, previniendo la aparición de sintomatología clínica.-

Este autor afirmó que al primer año de vida, el porcentaje de animales que poseen Ac es mucho mayor que los casos clínicos que se presentaron, por lo que las considera infecciones de tipo subclínico. (124). También podría discutirse lo que se ha propuesto para otros virus Herpes: que la inmunización ya sea pasiva o activa previene la sintomatología clínica pero no impide una in

fección localizada y subsiguiente respuesta de Ac.(123)

Se ha encontrado que el Haras N°1 existe un 71,4% de animales menores de 6 meses positivos por SN y, de estos, el 14,2% posee título de 1/8, el 28,5% de 1/16 y el 28,5% restante de 1/32. En el mismo Haras N°2 el porcentaje de animales positivos es menor, llegando a valores de 57,1% y de ellos, el 14,2% y el 42,8% posee títulos de 1/8 y 1/16 respectivamente.-

El 57,1% de potrillos entre 6 meses y un año de edad en ambos establecimientos son positivos y en este caso también se encuentra que los títulos alcanzados en el Haras N°1 son mayores que los hallados en el Haras N° 2 lo que podría sugerir una mejor respuesta inmune de los animales del primer centro de cría. (Tabla N° 6y7 y Gráfico N° 8).-

Los Ac FC aparecen, en los dos establecimientos en los animales menores de 6 meses que recibieron vacuna. En el caso de los potrillos entre 6 meses y un año de edad, no se detectan estos Ac en el Haras N°1 lo que estaría en relación al plan de vacunación ya que estos animales habían recibido vacuna 2 meses antes de la toma de la muestra y por lo tanto los títulos de Ac estarían en franca declinación. (Gráficos N° 5 y 6)

En el Haras N°3 que no vacuna los animales de 4 o 5 meses no poseen Ac N lo que se relacionaría a la desaparición de los Ac calostrales y a la falta de inmunidad activa inducida por infección natural o por vacuna-

ción. (21, 112, 124). En el grupo de animales mayores de 6 meses y hasta un año de edad se encuentra 33,3% de animales positivos por SN con títulos de 1/8 y no se observan reactores por FC lo que sugiere una infección ocurrida, al menos 3 meses antes (Gráficos N° 7 Y N° 8)

Gleeson y Coggins reafirman que el nivel de AcN es mantenido por sucesivas reinfecciones en los equinos jóvenes. (63). Si observamos a los animales de dos años en los Haras N°1 y N°2, encontramos 20 y 60% de positivos respectivamente. En los casos hallamos títulos bajos, lo que podría deberse a que estos animales habían recibido su última dosis de vacuna 7 meses antes de la toma de la muestra. En el Haras N°3 detectamos 34,7% de positivos con título de Ac N de 1/8. (Gráfico N° 8)

Sólo el 20% de los animales del Haras N°2 (Gráfico N° 6) y 8,6% del Haras N°3 (Gráfico N° 7) son reactores por FC, lo que seguramente se debe a una infección natural ocurrida aproximadamente 2 meses atrás.-

Los animales de 4 años de los tres centros de cría corresponden a hembras destinadas a reproducción y en algunos casos padrillos. Por SN encontramos 50% de positivos con títulos de 1/16 para cada uno de los dos primeros establecimientos y 40% de positivos con título de 1/8 en el tercer caso (Gráfico N° 9). No hallamos Ac FC en los Haras N°1 y N°2 lo que demuestra que los Ac N que poseen estos animales se deben a infecciones o vacunaciones anteriores, mientras que en el Haras N°3 existen 20%

de reactores por FC debido a infecciones naturales previas. (Gráficos N°5 , N°6 y N°7).

El grupo de 5 a 10 años también incluye las hembras gestantes. En el Haras N°1 hallamos 100% de positivos con 60% de título 1/32, el 20% de 1/64 y 20% de 1/8. En el Haras N°2 encontramos 75% de reactores con 50% de título 1/16, 12,5% de 1/8 y 12,5% de 1/32. En el Haras N°3 sólo se detectaron 18,5% de positivos con títulos entre 1/8 y 1/32. (Gráfico N° 9)

En los dos primeros establecimientos, encontramos 20 y 37,5% de reactores por FC. Algunos de estos animales habían recibido una dosis de vacuna 15 días antes de la extracción de la muestra lo que justifica la aparición de estos Ac (Gráficos N° 5 y N° 6). En el Haras N°3 se detectó sólo un 3,7% de positivos en concordancia con posibles infecciones virales previas. (Gráfico N° 7)

Entre los animales de 11 a 15 años hallamos 100 y 87,5% de positivos por SN en los Haras N°1 y N°2 respectivamente y los títulos alcanzados, en algunos casos, llegaron a 1/64. En el Haras N°3 los animales se agruparon desde 11 años en adelante y se detectaron 58,3% de positivos siendo el mayor título de Ac N hallado, de 1/32. (Gráfico N° 9).

La falta de Ac FC en los animales del Haras N°1 y N°2, se debe a que como se trata de hembras preñadas de 4 meses, aún no fueron revacunados y no hay antecedentes de virus activo en el plantel. (Gráficos N° 5 y N° 6)

En el Haras N°3 sólo encontramos 8,33% de positivos por FC coincidente con un animal positivo por SN lo que podría sugerir una infección natural (Gráfico N° 7)

En los Haras N°1 y N°2, el último grupo etario pertenece a los animales mayores de 15 años habiéndose hallado 76,9% y 75% de positivos respectivamente, con títulos que llegaron hasta 1/64 y 1/128 en el primer establecimiento y 1/64 en el segundo. (Gráfico N° 9)

Los reactores por FC fueron de 23% para el Haras N°1 y coincidieron con animales en gestación recientemente vacunados. Se registró 8,3% en el segundo Haras correspondiendo en este caso a animales sin vacunar, lo que nos podría estar indicando una infección reciente. (Gráficos N° 5 y N° 6)

La observación del gráfico comparativo de los títulos de Ac N hallados en hembras preñadas (Gráfico N° 2), nos muestra que en el Haras N°1, el título alcanzado fue bastante elevado (1/128) en los animales vacunados, mientras que en el Haras N°2 no sucedió lo mismo y no se superó el título 1/32. Si consideramos que las vacunaciones de las hembras tienen por objeto elevar los títulos de Ac lo suficiente como para prevenir la infección que las pueda conducir al aborto (13), se observa que en este segundo grupo, los animales se encuentran más expuestos que en el primer establecimiento.-

Recientemente se procesó material proveniente de dos fetos abortados en el Haras N°2 habiéndose aisla-

do VHE lo cual fue corroborado por estudios virológicos y histopatológicos. Estos hallazgos confirman la falta de protección en este establecimiento, resultados que eran presumibles según los resultados de los estudios serológicos realizados.-

Esta deficiencia en el título de Ac N referida a estos establecimientos fue observada en todos los grupos etarios y sobre todo en potrillos menores de un año, donde los valores de títulos de Ac N del segundo establecimiento fueron menores que en el primero, por lo que pensamos en una menor respuesta inmune experimentada en estos animales que podría deberse a la calidad del inmunógeno utilizado, o a las diferentes condiciones de cría y manejo (movimientos de animales, condiciones de estrés etc.)-.

Puede observarse, en general, que existe lógicamente, mayor porcentaje de reactores por ID y SN en los animales de los establecimientos donde se utiliza vacuna, mientras que el Haras N°3, que no vacuna, mantiene bajos porcentajes de positivos. (Tabla N° 14).

Con el análisis de estos resultados por la prueba del "chi cuadrado" corroboramos que el porcentaje de positivos hallados en los Haras N°1 y N°2 que utilizan vacunas son muy significativos, no se deben al azar; mientras que en el Haras N°3 el valor encontrado no es significativo, es debido al azar es decir a descargar antigénicas no planeadas.-

Es claro además, que los animales de más de 10 años de edad son los que desarrollan mayor título de Ac, lo que coincide con las descripciones de otros autores que demuestran que la protección contra la infección estaría determinada por repetidas exposiciones al virus, ya sea en forma natural como por vacunación. (12,27)

Si bien esto se observa en los tres establecimientos analizados, también se encuentra que la asociación existente entre el número de positivos y el título de Ac N hallado es "inversa", es decir, que existe correlación con pendiente negativa, o sea son pocos los animales con altos títulos de Ac N. (Tabla N°10, Gráfico N°1)

Si observamos los resultados obtenidos con las muestras del Hipódromo de La Plata (Gráfico N°10 y N°11) notamos que entre los animales de 2 años encontramos un 26% de positivos con títulos de Ac N de 1/8 y 1/16, pero no aparecen Ac FC, lo que hace suponer que los Ac N podrían deberse a vacunaciones que los animales recibieron cuando aún se encontraban en los Haras, o bien a alguna exposición no reciente al virus.-

Entre los animales de 3 y 4 años, se encuentran 19 y 33,3% de positivos por SN respectivamente, y sólo en el grupo de 4 años, los títulos llegan a 1/16.-

En ambos grupos, existe alrededor de un 5% de reactores por FC que coinciden con animales con título de Ac N de 1/8. Podría suponerse que se trata de animales que estarían padeciendo la enfermedad en forma subclínica.-

Entre los animales de 5 años, encontramos un 29,4% de positivos por SN con títulos de hasta 1/16 y no existen Ac FC. Lo mismo se observa entre los animales de 6 años y más edad pero en este caso sólo se presentan 8,33% de positivos.-

Si consideramos que dentro de este centro deportivo, tenemos animales previamente vacunados como también sin vacunar, es lógico que no encontremos un porcentaje alto de animales positivos como los observados en los Haras N°1 y N°2, ni tan bajo como los hallados en el Haras N°3, resultado que es corroborado por la prueba de "chi cuadrado" que nos dá un valor "significativo". (Tablas N° 4 y 12)

Ahora bien, si tenemos en cuenta las consideraciones expuestas anteriormente en que decimos que los niveles de Ac se ven incrementados con repetidas exposiciones al virus, como también por las sucesivas infecciones con distintas cepas (63, 124) y por lo tanto son más elevados en animales de mayor edad, cabría esperar que entre los animales del grupo de 6 años y más edad, en donde se encuentran algunos de 7 y 8 años, existiera un porcentaje más elevados de positivos con títulos más altos. En este estudio esto no se observa, por lo contrario, sólo existe un 8% de positivos y con títulos de 1/8. Esto lleva a suponer que el virus no se encuentra circulando activamente en esta población. También podemos considerar una depresión en la respuesta del sistema inmune de estos ani

males, que generalmente se encuentra alterada debido a los tratamientos típicos a los que se ven sometidos cuando se encuentran en entrenamiento en los centros deportivos, por ejemplo las inoculaciones prolongadas de corticoides. Teniendo en cuenta esta última posibilidad, en caso de producirse brotes de la enfermedad, los animales estarían prácticamente desprotegidos contra la infección.-

Del estudio comparativo de las técnicas serológicas descritas, se infiere que la ID podría ser utilizada sólo para realizar relevamientos serológicos poblacionales, que permiten detectar animales, francamente positivos (títulos de Ac N mayor de 1/16). Su importancia diagnóstica se ve entonces limitada debido a su menor sensibilidad relativa.-

La FC, de alta sensibilidad, no es de gran utilidad en estudios epidemiológicos por la poca persistencia de los Ac FC, pero sí posee un alto valor para el diagnóstico de infecciones activas recientes incluyendo abortos. (40).

La SN es de alta sensibilidad y con ella pueden ser detectados Ac por largos períodos de tiempo, además es un índice de nivel de protección alcanzado, por lo que hasta el momento es la técnica de elección.-

Existen otras pruebas de igual o mayor sensibilidad, tal como el enzimo-inmunoanálisis (ELISA) que ofrece además la ventaja de su practicidad, aunque debe considerarse como una desventaja, su alto costo. En el futuro se

realizarán estudios empleando esta metodología con el objeto de avanzar en el diagnóstico de esta virosis.-

Los datos obtenidos en este estudio, nos permitieron conocer el estado inmune mediado por Ac contra VHE en algunas poblaciones equinas del país.

Pero no podemos determinar aún si la infección natural que hayan tenido los animales se debió a VHE-1 o VHE-4 aunque es sabido que los Ac protectores que poseen, actuarán ya sea con uno u otro virus debido a que los animales se encuentran antigénicamente relacionados. (52)

Resulta necesario continuar con los estudios referidos a la respuesta inmune resultante de infecciones y reinfecciones, con el fin de evaluar también los mecanismos inmunes mediados por células que sabemos están involucrados. (30,44,60,103,136)

Otro de los puntos analizados en el presente trabajo fue el estudio comparativo de los títulos de Ac en los animales vacunados y no vacunados, lo que nos permitió evaluar la respuesta producida por la vacunación. Sería importante profundizar en estos aspectos con el fin de poder diferenciar Ac producidos por infección natural o por vacunación usando la nueva tecnología aportada por ingeniería genética y Ac monoclonales.-

Los datos obtenidos en este trabajo sumados a futuros estudios relacionados a las cepas virales actuantes en el país, nos permitirán esclarecer aún más la real significancia de esta virosis, como así también, podrán ser utilizados por las autoridades sanitarias, para decidir si se desarrollan en el país planes de control reglamentados.-

-CONCLUSIONES-

- 1) El VHE-1 replica perfectamente en cultivos primarios de RFE y células de línea RK 13 produciendo un neto efecto lítico.-
 - 2) Los Ac N que son detectados por prolongados períodos de tiempo fueron tomados como referencia para relacionarlos con el nivel de protección en los planteles de animales vacunados y no vacunados. Se propone su uso para demostrar seroconversión en estudios diagnósticos.
 - 3) En el plantel de animales vacunados cuyas hembras demostraron bajo nivel de Ac N se constataron abortos producidos por VHE-1.-
 - 4) El título de Ac N fue mayor en los establecimientos que utilizan vacuna.-
 - 5) Los animales en entrenamiento, vacunados y no vacunados, demostraron títulos de Ac N bajos constituyendo por lo tanto, una población de riesgo ante una infección con VHE-1.-
 - 6) La ID, de importancia diagnóstica limitada debido a su menor sensibilidad relativa, es de utilidad para una primera detección de reactores.-
 - 7) La detección de Ac FC, de poca persistencia, es valiosa para determinar infecciones recientes, incluyendo abortos.-
 - 8) Los reactores a cualquiera de las técnicas empleadas, no permite discriminar Ac vacunales de aquellos producidos por una infección natural.-
- Modernas técnicas de Biología molecular y Ac monoclonales, en uso para otros virus Herpes, permitirán dilucidar estos aspectos.-

-R E S U M E N-

Se realizó un estudio serológico en algunas poblaciones del país, con el objeto de determinar el porcentaje de reactores de Virus Herpes Equino-1 (VHE-1) mediante el empleo de tres técnicas para la detección de anticuerpos específicos.-

Se tomaron muestras de 185 animales pertenecientes a 3 establecimientos de cría. Otros 96 sueros provenían de equinos en entrenamiento del Hipódromo de La Plata. Los animales se clasificaron en dos categorías: vacunados y no vacunados.-

Las técnicas serológicas empleadas en el estudio fueron: Seroneutralización (SN), Inmunodifusión (ID), y Fijación de Complemento (FC) y se realizaron utilizando una cepa viral originalmente aislada en el país y sueros controles de referencia.-

La SN fue seleccionada como prueba de referencia por su mayor sensibilidad y relación con el nivel de protección de los animales involucrados. Además los Anticuerpos neutralizantes (Ac N) pueden ser detectados por períodos más prolongados.-

La ID, demostró un límite de sensibilidad correspondiente a un título por SN de 1/16.-

La FC, debido a la poca persistencia de estos Anticuerpos, resultó de valor diagnóstico para infecciones recientes, incluyendo abortos.-

Se determinó que en los 2 establecimientos de cría que utilizan vacuna, el porcentaje de animales positivos es del 66 y 63 % respectivamente habiéndose detectado títulos de Ac N de hasta 1/128. En el Haras que no utiliza vacuna, el porcentaje de positivos y el título de Ac N máximo observado fue de 26% y 1/32 respectivamente. En el Hipódromo de La Plata donde existen animales vacunados y no vacunados, se obtuvo 24% de reactores con títulos no mayores de 1/16.-

-S U M M A R Y-

A seroepidemiological study was conducted in Argentine horses in order to determine exposure to EHV-1. Specific antibodies were detected by three different techniques.-

A total of 185 serum samples were obtained from 3 breeding farms. Additionally, 96 horses in training in La Plata Race Track were included. The animals were grouped in vaccinated and non-vaccinated.-

The following methods were employed: Seroneutralization (SN), Immunodiffusion (ID), and Complement Fixation (CF) using a local viral strain as antigen and reference control sera.-

The SN was the most sensible among the test

used. In addition, SN antibodies are detected for longer periods and are close related with the levels of protection. Based on these reasons SN was chose as reference test.-

SN antibody titers 1:16 and higher were detected by ID.

The CF antibodies remain during short period post-infection. For that reason, this test could be used as diagnostic method in abortions and recent infections.-

In two breeding farms that employe vaccines, 66 and 33% of positive cases were found. The highest SN titers observed were 1:128. In one breeding farm that does not use vaccines, only 26% of the animals were positive and the highest SN titers found were 1:32.-

Regarding horses in trainin , vaccinated and non-vaccinated, 24% of them were positive with titers below 1:16.-

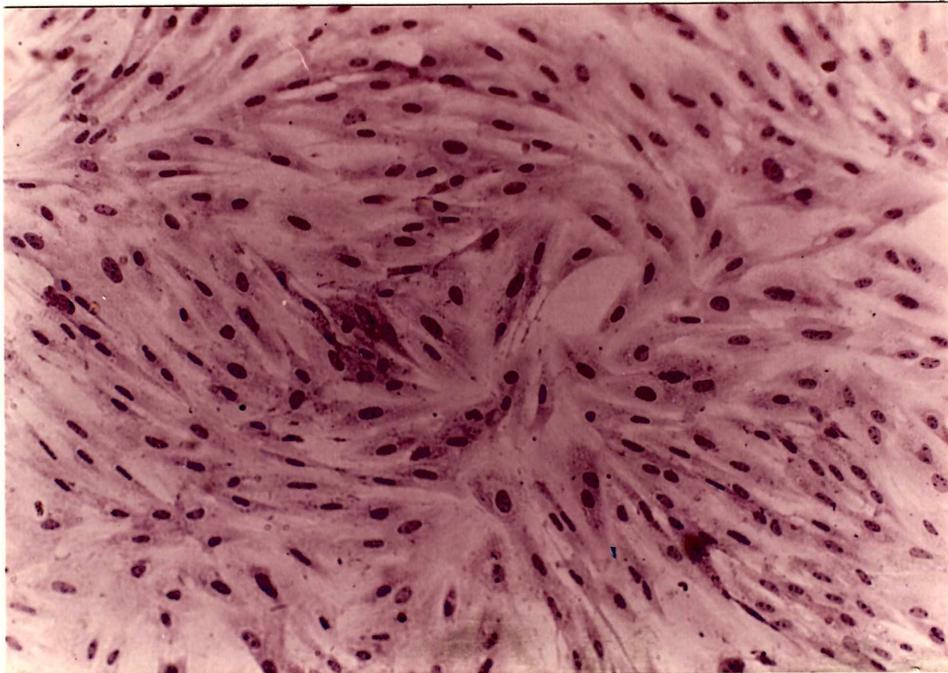


FOTO N° 1: Monocapa de células de riñón de feto equino (RFE) (Tinción Hematoxilina y Eosina). 100 X.-.

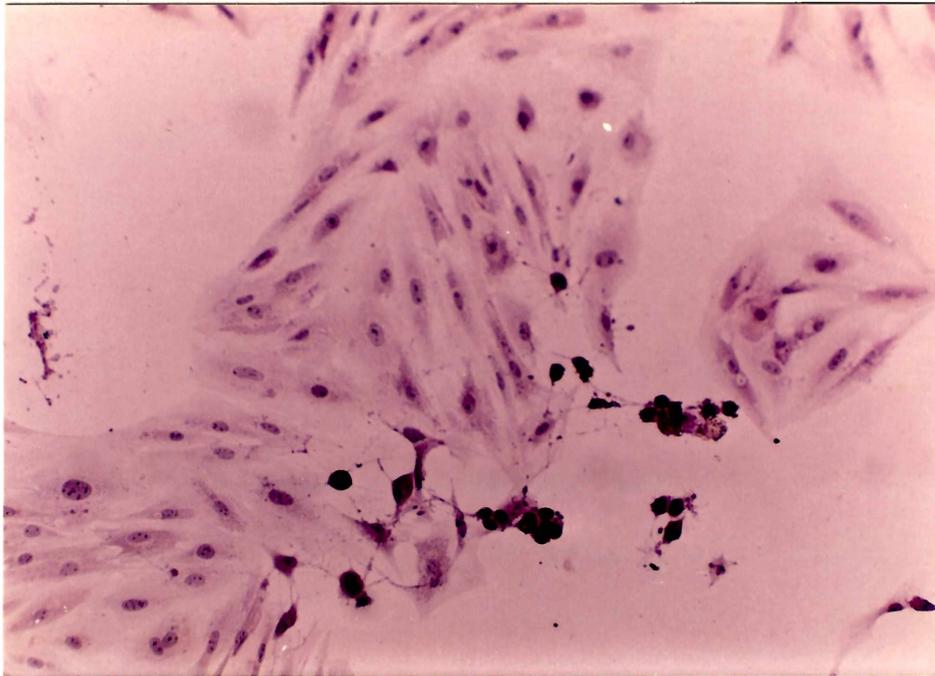


FOTO N°2: Monocapa de células de riñón de feto equino (RFE) inoculada con VHE-1 (Tinción Hematoxilina y Eosina) 100X

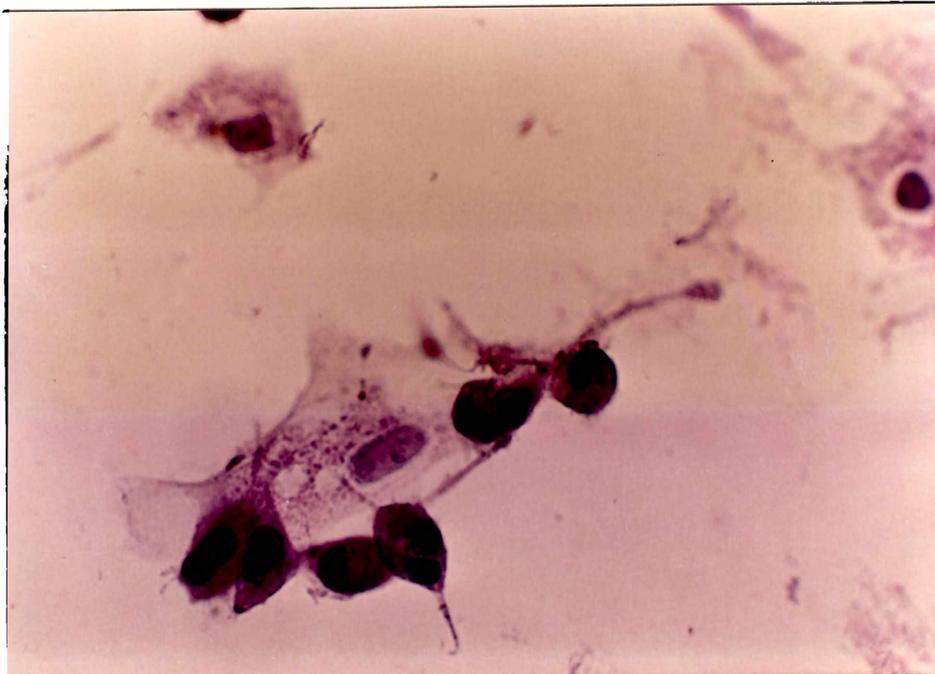


FOTO N°3: Monocapa de células de riñón de feto equino (RFE) inoculada con VHE-1 (Tinción Hematoxilina y Eosina) 400 X.

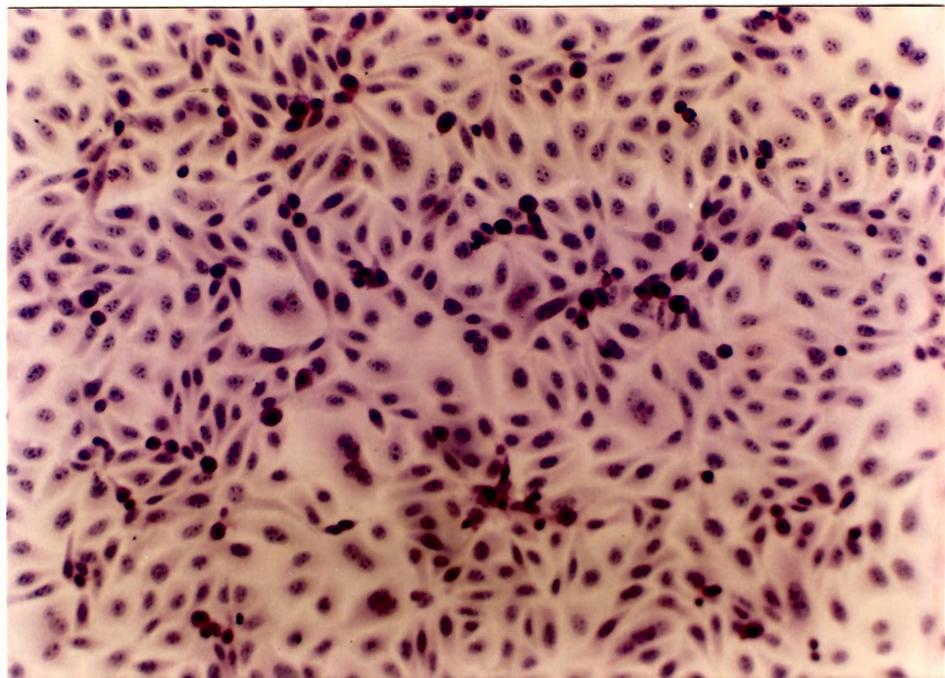


FOTO N°4: Monocapa de células RK 13 (Tinción Hematoxilina y Eosina) 100 X.-

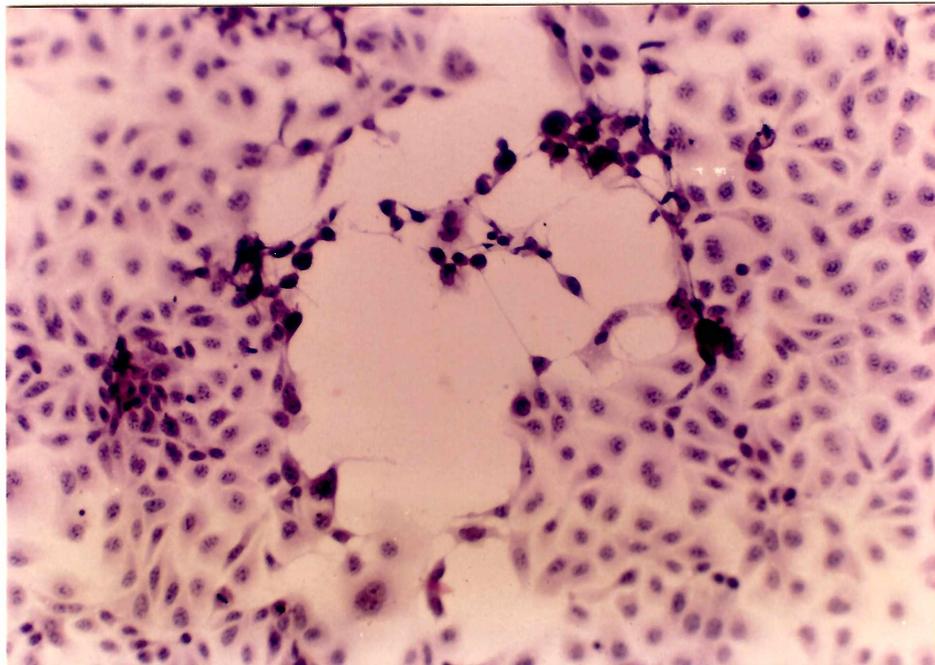


FOTO N°5: Monocapa de células RK 13 inoculada con VHE-1 (Tinción Hematoxilina y Eosina)
100 X.-

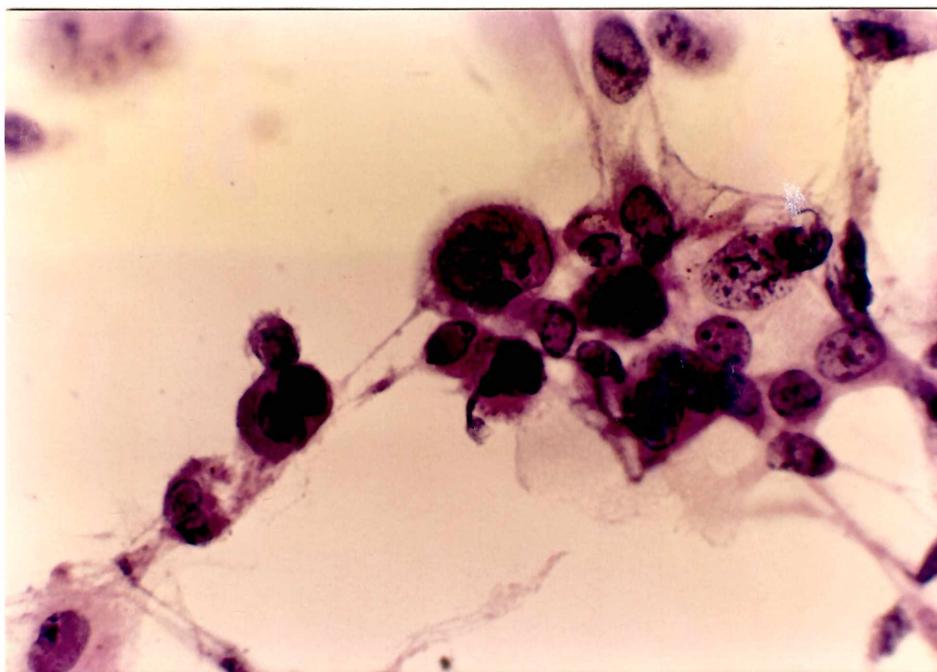


FOTO N°6: Monocapa de células RK 13 inoculada con VHE-1 (Tinción Hematoxilina y Eosina)
400 X.-

BIBLIOGRAFIA

- 1- ADLER, E. Manual de fijación del complemento para serología de Fiebre Aftosa. 2 Manual Técnico, INTA, Argentina, 1967.
- 2- ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of Equine herpesvirus-1 infections. In, Prog. Vet. Microbiol. Immun. Vol,2 78-144 (Karger-Base) 1986.
- 3- ALLEN, G.P.; TURTINEN, L .W. Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of Equine herpesvirus-1. Journal of Virology Vol.44 N°1:249-255, 1982.
- 4- ALLEN, G.P.; YEARGAN, M.R.; TURTINEN, L.W.; BRYANS,J.T. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. Am.J.Vet.Res.Vol. 46 N°1: 138-140, 1985.
- 5- ALLEN, G.P.; YEARGAN, M.R.; TURTINEN, L.W.; BRYANS, J.T.; Mc COLLUM, W.H. Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. Am.J.Vet.Res.Vol. 44 N°2:263-271, 1983.
- 6- BARTHA, A. The virology of Equine herpesvirus-1 infection. In, Proc. of the 2nd Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.:18-23, París 1969.
- 7- BORGEN, H.C. Differentiation of Equine herpesvirus type 1 strains by a plaque marker. Arch. für die Gesamte Virusforschung 32: 283-285, 1970.

- 8- BRADSTREET, C.; TAYLOR, C.D. Technique of complement-fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases. Monthly Bull. Ministry of Health (UK) 21; 96-109, 1962.
- 9- BRION, A.J.; FONTAINE, M.; FONTAINE, M.P.; MORAILLON, R. MORAILLON, A. Preliminary investigations on Rhinopneumonitis in France. In, Proc. of the 1st Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 137-140, Italy, 1966.
- 10- BRYANS, J.T. Application of management procedures and prophylactic immunization to the control of equine rhinopneumonitis. Proc. 26th Annu. Conv. Am. Ass. Equine Practitioners , pp: 493-498, Anaheim 1981.
- 11- BRYANS, J.T. Herpesviral disease affecting reproduction in the horses. Vet. Clin. N. Am., Large Anim. Pract. 2: 303-312, 1980.
- 12- BRYANS, J.T. Serologic responses of pregnant thoroughbred mares to vaccination with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. Am.J.Vet.Res. Vol.41 N°11: 1743-1746, 1980.
- 13- BRYANS, J.T. Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 83-92, Lyon 1976.
- 14- BRYANS, J.T. On immunity to disease caused by Equine herpesvirus-1 . J.A.V.M.A. Vol. 155 N°2: 294-300, 1969.
- 15- BRYANS, J.T.; ALLEN, G.P. Equine viral rhinopneumonitis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. Vol. 5 N°4:837-847, 1986.
- 16- BRYANS, J.T.; ALLEN, G.P. In vivo and in vitro studies of equine coital exanthema. In, Proc. of the 3rd Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 322-336, Paris 1972.

- 17- BURROWS, R. The general virology of the Herpesvirus Group. In, Proc. of the 2nd Int. Conf. on Eq. Inf.Dis.: 1-12, París 1969.
- 18- BURROWS, R.; GOODRIDGE, D. Equid herpesvirus-1 (EHV-1): some observations on the epizootiology of infection and on the innocuity testing of live virus vaccine. Proc. 24th Annu. Conv.Am.Ass.Equine Practitioners, pp:17-28, St Louis 1977.
- 19- BURROWS, R.; GOODRIDGE, D. In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis virus strains. In, Proc. of the 3rd Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.:306-321, París 1972.
- 20- BURROWS, R.; GOODRIDGE, D.; DENYER, M.S. Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. The Veterinary Record 114:369-374, 1984.
- 21- CAMPBELL, T.M.; STUDDERT, M.J. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1). Vet. Bull.Vol.53 N°2: 135-146, 1983.
- 22- CARROL, C.L.; WETBURY, H.A. Isolation of Equine herpesvirus type 1 from the brain of a horse affected with paresis. Aust. Vet. Journal Vol.62 N°10:345-346, 1985.
- 23- COOPER, N.R.; WELSH, R.M. Antibody and complement-dependent viral neutralization. Springer Semin. Immunopathol. 2:285-310, 1979.
- 24- COTO, C.E.; de TORRES, R.A. Naturaleza y estructura de los virus animales. Edigem S.A., Buenos Aires, Argentina, 1983.
- 25- CRANDELL R.A. Selected animal herpesviruses: new concepts and technologies. In, Advances in veterinary science and comparative medicine Vol.29, pp:281-294 (Academic Press) 1985.

- 26- CRANDELL, R.A.; ANGULO, A.B. Equine herpesvirus-1: antibodies in stillborn foals and weak neonates. Veterinary medicine Vol. 80: 73-75, 1985.
- 27- CRANDELL, R.A.; MOCK, R.E.; LOCK, T.F. Vaccination of pregnant ponies against equine rhinopneumonitis. Am.J. Vet. Res. Vol.41 N°7:994-996, 1980.
- 28- CHARLTON, K.M.; MITCHELL, D.; GIRARD, A.; CORNER, A.H. Meningoencephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus-1 infection. Vet.Pathol. 13:59-68, 1976.
- 29- CHOWDHURY, S.I.; KUBIN, G.; LUDWIG, H. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in lippizaner stud: a contribution to the classification of equine herpesvirus. Arch. Virol. 90: 273-288, 1986.
- 30- DARLINGTON, R.W. The role of equine macrophages in resistance or susceptibility to infection by equine herpesvirus 1. In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 129-139, Lyon 1976.
- 31- DE DIEGO, A.I. Guía para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (Aves y mamíferos). Ed. del autor, Buenos Aires, Argentina, pp: 587, 1974.
- 32- DIMOCK, W.W.; EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W. Infections observed in equine fetuses and foals. Cornell Vet. 37: 89-99, 1947.
- 33- DINTER, Z.; KLINGEBORN, B. Serological study of an outbreak of paresis due to equine herpesvirus-1 (EHV-1) Veterinary Record 99: 10-12, 1976.

- 34- DIXON, R.J.; HARTLEY, W.J.; HUTCHINS, D.R.; LEPHERD, E.E.; FEILEN, E.; JONEST, R.F.; LOVE, D.N.; SABINE, M.; WELLS, A.L. Perinatal foal mortality associated with a herpes-virus. Aust. Vet. Journal. Vol. 54: 103-105, 1978.
- 35- DOLL, E.R. Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters. J.A.V.M.A. Vol. 139 N°12: 1324-1330, 1961.
- 36- DOLL, E.R. Intrauterine and intrafetal inoculations with equine abortion virus in pregnant mares. Cornell Vet. 43: 112-121, 1953.
- 37- DOLL, E.R.; BRYANS, J.T. Epizootiology of equine viral rhinopneumonitis. J.A.V.M.A. Vol. 142 N°1: 33-37, 1963.
- 38- DOLL, E.R.; BRYANS, J.T. Incubations periods for abortion in Equine viral rhinopneumonitis. J.A.V.M.A. Vol. 141: 351-354, 1962.
- 39- DOLL, E.R.; BRYANS, J.T. Development of complement-fixing and virus-neutralizing antibodies in viral rhinopneumonitis in horses. Am. J. Vet. Res. 23: 843-846, 1962.
- 40- DOLL, E.R.; Mc COLLUM, W.H.; WALLACE, E.; BRYANS, J.T.; RICHARDS, M.G. Complement-fixation reactions in equine viral abortion. Am. J. Vet. Res. 14: 40-45, 1953.
- 41- DOLL, E.R.; RICHARDS, M.G.; WALLACE, M.E. Adaptation of equine abortion virus to suckling Syrian hamsters. Cornell Vet. 43: 551-558, 1953.
- 42- DOLL, E.R.; WALLACE, M.E. Cultivation of equine abortion and equine influenza viruses on the chorioallantoic membrane of chicken embryos. Cornell Vet. 44: 453-461, 1954

- 43- DOLL, E.R.; WALLACE, M.E.; RICHARDS, M.G. Thermal, hematological and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. *Cornell Vet.* 44: 181-190, 1954.
- 44- DUTTA, S.K.; CAMPBELL, D.L. Cell mediated immunity in equine herpesvirus type 1 infection. In vitro lymphocyte blastogenesis and serum neutralization antibody in normal parturient and aborting mares. *Can. J. Comp. Med.* Vol.41 N°4: 404-408, 1977.
- 45- DUTTA, S.K.; SHIRPLEY, W.D. Immunity and the level neutralization antibodies in foals and mares vaccinated with a modified live-virus rhinopneumonitis vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 36: 138-139, 1982.
- 46- ENGELS, M.; NOWOTNY, N.; METZLER, A.E.; WYLER, R.; BURKI, F. Genomic and antigenic comparison of an Equine herpesvirus-1 (EHV-1) isolate from the 1983 lippizan abortion storm with EHV-1 reference strains. *Microbiologica*, 9: 221-234, 1986.
- 47- EPSTEIN, A.L. Herpes Simplex Virus 1, un virus no tan simple. *En, Adel. Microbiol. Enf. Infec.* Vol 5, 37, pp: 39-86 (por Celia E. Coto, Roberto Cacchione y Ramón de Torres) Edigraf S.A. 1986.
- 48- EPSTEIN, M.A.; HOLT, S.J. Adenosine triphosphatase activity at the surface of nature extracellular herpes virus *Nature* 198: 509-510, 1963.
- 49- ETCHEVERRIGARAY, M.E.; OLIVA, G.A.; GONZALEZ, E.T.; NOSETTO, E.O.; MARTIN, A.A. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Rev. Mil. Vet.* 30: 138-139, 1982.

- 50- ETCHEVERRIGARAY, M.E.; SCIUTTO, D.; SCHUDEL, A.A.; PEREZ AZUMENDI, R. Rinoneumonitis Equina I: Detección de anticuerpos precipitantes en caballos de la Provincia de Buenos Aires. Rev.Mil.Vet. Vol.25 N°115: 173-175, 1978.
- 51- FARRELY, B.T. Abortions associated with equine rhinopneumonitis viral infection in Ireland. In, Proc. of the 1st Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 131-136, Italy 1966.
- 52- FENNER, F.; BACHMAN, P.A.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. Herpesviridae. In, Veterinary Virology pp: 339-373 (Academic Press, Inc) 1987.
- 53- FITZPATRICK, D.R.; STUDDERT, M.J. Immunologic relationships between equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus). Am.J.Vet.Res. Vol. 45 N°10: 1947-1952, 1984.
- 54- FU, Z.F.; ROBINSON, A.J.; DICKINSON, L.G.; GRIMMETT, J.B. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1): infection and vaccination with an inactivated EHV-1 vaccine. New Zeland Vet. Journal 34: 14-15, 1986.
- 55- GADLER, H.; WAHREN, B. Association between virus and cell. DNA during latent cytomegalovirus infection in vitro. Arch. Virol. 75: 291-298, 1983.
- 56- GALOSI, C.M.; GIMENO, E.J.; NOSETTO, E.O.; MARTIN, A.A.; OLIVA, G.A.; ANDO, Y.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Herpes Virus Equino-1: formas clínicas de presentación y diagnóstico. Segunda Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, Azul, Argentina, 1986.

- 57- GALOSI , C.M.; NOSETTO, E.O.; GIMENO, E.J.; GOMEZ DUNN,C.:
ETCHEVERRIGARAY, M.E.; ANDO, Y. Equine herpesvirus 1 (EHV-1)
Characterization of a viral strain isolated from equine
plasma in Argentine. In press. Rev. Sci. Tech. Off. Int.
Epiz. 1988.
- 58- GALOSI, C.M.; OLIVA, G.A.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Caracte-
rísticas morfológicas de las placas de lisis producidas por
la cepa SP-1 del virus herpes equino tipo 1. Su utilización
en la identificación de cepas. En prensa, Revista de la
Asociación Argentina de Microbiología Vol. 20 N°3, 1988.
- 59- GENTRY, G.A.; RANDALL, C.C. The physical and chemical
properties of the Herpesviruses. In, The Herpesviruses
pp: 45-93 (AS Kaplan, ed. New York, Academic Press) 1973.
- 60- GERBER, J.D.; MARRON, A.E.; BASS, E.P.; BECKENHAUER, W.R.
Effect of age and pregnancy on the antibody and cell-
mediated immune responses of horses to equine herpesvirus 1
Can. J. Comp. Med. 41: 471-478, 1977.
- 61- GIBSON, W.; ROIZMAN, B. Proteins specified by herpes
simplex virus.VIII. Characterization and composition of
multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. J. Virol. 10:
1044-1052, 1972.
- 62- GIMENO, E.J.; NOSETTO, E.O.; MARTIN, A.A.; GALOSI, C.M.;
ANDO, Y. Demonstration of Equine herpes virus 1 (EHV-1)
in histological sections an tissue cultures by the peroxi-
dase-antiperoxidase (PAP) technique. J.Vet.Med.B 34: 740-
742, 1987.
- 63- GLEESON, L.J.; COGGINS, L. Response of pregnant mares to
Equine herpesvirus 1 (EHV-1). Cornell Vet.70:391-400, 1980.

- 64- GREENWOOD, R.E.S.; SIMPSON, A.R.B. Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Vet. Journal* 12: 113-117, 1980.
- 65- HAMPAR, B.; MARTOS, L.M. Immunological relationships. In, *The Herpesviruses* pp: 221-259 (AS Kaplan ed. New York, Academic Press) 1973.
- 66- HENRY, B.; ROBINSON, R.A.; DAHUEHIAUER, S.A.; O'HERTON, S.S.; HAYWARD, G.S.; O'CALLAGHAN, D.J. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology* 115: 97-114, 1981.
- 67- HILL, T.J. Herpes Simplex Virus latency. In, *The Herpesviruses* Vol. 3 pp 175-231 (by B.Roizman, Plenum Press, New York) 1985.
- 68- HOLMES, D.F.; KEMEN, M.J.; JOUBERT, J. Differentiation of field strains and a vaccine strains of Equine herpesvirus using plaque characteristics. *Am.J.Vet.Res* 40: 305-306, 1979.
- 69- HONESS, R.W.; ROIZMAN, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J.Virol.* 14: 8-19, 1974.
- 70- IHARA, S.; FELDMAN, L.; WATANABE, S.; BEN PORAT, T. Characterization of the immediate early functions of pseudorabies virus. *Virology* 131: 437-454, 1983.
- 71- JACKSON, T.A.; KENDRICK, J.W. Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *J.A.V.M.A.* 158: 1351-1357, 1971.

- 72- JACKSON, T.A.; OSBURN, B.I.; CORDY, D.R.; KENDRIK, J.W.
Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the
experimentally induced neurologic disease. J.A.V.M.A. 38:
709-719, 1977.
- 73- JOHNSON, D.C.; SPEAR, P.G. Monensin inhibits the proce-
ssing of Herpes simplex virus glycoproteins, their trans-
port to the cell surface and the egress of virions from
infected cells. J.Virol. 43: 1102-1112, 1982.
- 74- KAWAKAMI, Y.; KAJI, T.; SUGIMURA, K.; SHIMIZU, T.; MATUMO-
TO, M. A preliminary survey for equine abortion virus in-
fection by complement fixation test in HOKKAIDO, Japan.
Japan, J.Exp.Med.Vol. 29, 3:203-211, 1959.
- 75- KAUFFMAN, R.; FIELDS, B. Pathogenesis of the viral infec-
tions. Virology pp: 153-167 (by B.N.Fields et al. Raven
Press, New York) 1985.
- 76- KLINGEBORN, B.; DINTER, Z. Equine abortion (Herpes) virus:
properties of the hemagglutinin in virus suspensions.
Virology 56: 164-171, 1973.
- 77- KLINGEBORN, B.; DINTER, Z. Measurement of neutralizing
antibody to equid herpesvirus 1 by Single Radial Hemolysis
Journal of Clinical Microbiology Vol. 7 N°5:495-496, 1978.
- 78- KLINGEBORN, B.; DINTER, Z. Attempts to characterize attenua-
ted vaccine strains of equine herpesvirus 1. In, Proc. of
the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 53-55, Lyon 1976.
- 79- LITTLE, S.P.; JOFIE, J.T.; COURTNEY, R.J.; SHAFFER, P.A.
A virion-associated glycoprotein essential for infectivity
of Herpes simplex virus type 1. Virology, 115:149-160, 1981.

- 80- LITTLE, P.B.; THORSEN, J. Disseminated necrotizing myeloencephalitis: a herpes associated neurological disease of horses. *Vet. Pathol.* 13: 161-171, 1976.
- 81- LUDWIG, H. Herpesvirus of bovidae: the characterization, grouping and role of different types, including latent viruses. In, *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, pp: 171-189 (by Wittman, G. et al, Martinus Nejhoff Publishers, Comission of the European Communities) 1984.
- 82- MASON, R.W.; Mc KAY, R.; LENGHAUS, C. Generalised congenital equine herpes virus infection in a neonatal foal. *Aus. Vet. Journal* Vol. 53: 606, 1977.
- 83- MATUMOTO, M.; ISHIZAKI, R.; SHIMIZU, T. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in various countries. *Arch. Ges. Virusforsch* 50: 606-623, 1965.
- 84- MAYR, A. Vaccination of horses against Equine herpesvirus 1 infection, In, *Proc. of the 2nd Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.:* 41-45, París, 1969.
- 85- MAYR, A.; THEIN, P.; SCHEID, R. Immunization experiments with inactivated equine herpesvirus 1. In, *Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.:* 57-67, Lyon 1976.
- 86- Mc COLLUM, W.H. Equine Rhinopneumonitis. In, *Proc. of the 1st Conf. Int. on Eq. Inf. Dis.:* 94-99, Italy 1966.
- 87- Mc COLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; BRYANS, J.T. Agglutination of horse erythrocytes by tissue extracts from hamsters infected with equine abortion virus. *Am.J.Vet.Res.* 17:267-270, 1956.

- 88- Mc COLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; WILSON, J.C.; JOHNSON, C.B.
Isolation and propagation of equine rhinopneumonitis virus
in primary monolayer kidney cell cultures of domestic ani-
mals. Cornell Vet. Vol LII N°2: 164-173, 1962.
- 89- Mc COLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; WILSON, J.C.; JOHNSON, C.B.
Plaque formation by equine rhinopneumonitis virus on mono-
layer cell cultures of equine, ovine and porcine kidneys.
Cornell Vet. Vol LII N°4: 534-542, 1962.
- 90- Mc GUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B. Passive immunity in the
foal: measurement of immunoglobulin classes and specific
antibody. Am.J.Vet,Res. 34: 1299-1303, 1973.
- 91- Mc KERCHER, D.G. Viruses of other vertebrates. In, The
Herpesviruses, pp: 428-494 (AS Kaplan ed. New York, Acade-
mic Press) 1973.
- 92- MITCHELL HOSKINS, J. Virological Procedures (Butterworth
ed., London) 1967.
- 93- MITCHELL, D.; PAPP-VID, G.; GIRARD, A. A challenge study
on pregnant pony mares following vaccination with a modi-
fied live equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine. In. Proc.
of the 4th Int.Conf. on Eq. Inf. Dis.: 69-73, Lyon 1976.
- 94- MOHANTY, S.B.; DUTTA, S.K. Virología Veterinaria pp:170-
174, (Nueva Editorial Interamericana, México) 1983.
- 95- MONTALI, R.J.; ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T.; PHILLIPS, L.G.;
BUSCH, M. Equine herpesvirus type 1 abortion in an onager
and suspected herpesvirus myelitis in a zebra. J.A.V.M.A.
Vol. 185 N°11: 1248-1249, 1985.

- 96- MORAS, E.V.; MARIANO, M.A.; GUIDA, N.; CRAIG, L.; BARBONI, A.H.; RODRIGUEZ, A.N.; VILLAHOZ, M.D.; MENCHACA, E.S. Aislamiento de una cepa de Herpes Equino-1 (HVE-1) en equinos SPC con sintomatología nerviosa. X Congreso Panamericano de Veterinaria y Zootecnia 322. Bs As, 1985.
- 97- MUMFORD, J.A.; THOMSON, G.R. Serological methods for identification of slowly-growing herpesvirus isolated from the respiratory tract of horses. In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 49-52, Lyon 1976.
- 98- MURPHY, F.A. Virus Taxonomy. In, Virology pp: 12-13 (by B.N.Fields et al. Raven Press, New York) 1983.
- 99- NOSETTO, E.O.; GALOSI, C.M.; OLIVA, G.A.; GONZALEZ, E.T.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Obtención de un antígeno para el diagnóstico de Rinoneumonitis Equina (HVE-1) por la prueba de doble inmunodifusión en agar (DIDA). Rev. Med. Vet. 66: 298-301, 1985.
- 100- NOSETTO, E.O.; GIMENO, E.J. Equine Herpes Virus-1 (EHV-1) Clínic, Epidemiology, Pathology and Control. Proc. SIDA (Swedish Internat. Develop. Authority) Regional Seminar. on Veter. Pathol. pp: 344-356, La Plata, 1985.
- 101- NOSETTO, E.O.; MONINA, M.I.; BASCHAR, H.; GALOSI, C.M.; GALLO, G.G.; IDIART, J.R.; GIMENO, E.J. Síndrome neurológico asociado a Herpes virus equino tipo 1 (HVE-1). Medicina Veterinaria. Barcelona ,España, 2:583-588, 1985.
- 102- O'CALLAGHAN, D.J.; ALLEN, G.P.; RANDALL, C.C. Structure and replication of the equine herpesviruses. In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 1-31, Lyon 1976.
- 103- PACHCIARZ, J.; BRYANS, J.T. Cellular immunity to equine rhinopneumonitis virus in pregnant mares. In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 115-127, Lyon 1976.

- 104- PASTORET, P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G.; VINDEVOGEL, H. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. In, Latent herpesvirus infections in veterinary medicine, pp: 211-227 (by Wittman G. et al, Martinus Nejhoff Publishers, Comission of the European Communities) 1984.
- 105- PATEL, J.R.; EDINGTON, N. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpes virus 1. *Vet. Microbiol.* 8:301-305, 1983.
- 106- PEET, R.L.; COACKLEY, W.; SMITH, V.W. Equine abortion associated with herpesvirus. *Aust. Vet. Journal* Vol. 54: 151, 1978.
- 107- PERDUE, M.L.; KEMP, M.C.; RANDALL, CH.C.; O'CALLAGHAN, D.J. Studies of the molecular anatomy of the LM cell strain of Equine herpesvirus type 1: proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Virology* 59: 201-216, 1974.
- 108- PETTE, J. Development of a living virus vaccine against rhinopneumonitis of horses. In, Proc. of the 1st Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 112-116, Italy 1966.
- 109- PLUMMER, G. Serological comparison of the Herpesviruses. *Brit. J. Exp. Pathol.* 45: 135, 1964.
- 110- PLUMMER, G.; WATERSON, A.P. Equine herpesviruses. *Virology* 19: 412-416, 1963.
- 111- PRICKETT, M.E. The pathology of disease caused by Equine herpesvirus-1. In, Proc. of the 2nd Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 24-33, Paris 1969.
- 112- PURDY, CH.N.; PORTER, R.C.; FORD, S.J. Equine rhinopneumonitis vaccine: immunogenicity and safety in foals. *Am.J. Vet. Res.* Vol 39 N°5: 745-752, 1978.

- 113- RAPP, F.; JERKOFKY, M.A.; Persistent and latent infections. In, The Herpesviruses pp: 271-289 (AS Kaplan ed. New York, Academic Press) 1973.
- 114- RAWLS, W.E. Herpes Simplex Virus. In, Virology pp:527-561 (by B.N.Fields et al. Raven Press, New York) 1985.
- 115- ROIZMAN, B. and BATTERSON W. Herpesvirus and their replication. In, Virology pp: 497-526 (by B.N.Fields et al. Raven Press, New York) 1985.
- 116- SABINE, M.; FEILEN, C.; HERBERT, L.; JONES, R.F.; WALLSER LOMAS, S.; LOVE, D.; WILD, J. Equine herpesvirus abortion in Australia 1977 to 1982. Equine Vet. Journal 15 (4): 366-370, 1983.
- 117- SAXEGAARD, F. Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. Nord. Vet. Med, 18:504-512, 1966.
- 118- SHARP, J.A. Introducción al cultivo de tejidos animales. Cuad. de Biol., Ed. Omega, 1980.
- 119- SHIMIZU, T.; ISHIZAKI, R.; MATUMOTO, M. Two distinct antigens, viral and soluble of equine rhinopneumonitis virus as revealed by complement fixation test. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 2(3): 117-127, 1962.
- 120- SIMPSON, T.; ROIZMAN, B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. Science. Vol. 214: 562-564, 1981.
- 121- SMITH, P.; CELEDON, M.; ZURITA, L.; BERRIOS, P. Estudio serológico de los virus Pi 3, IE y He-1 en equinos fina sangre de carrera del Hipódromo Chile. ARCH.Med.Vet. VOL XVIII N°1: 29-35, 1986.

- 122- SNYDER, D.B.; MYRUP, A.C.; DUTTA, S.K. Complement requirement for virus neutralization by antibody and reduced serum complement levels associated with experimental Equine herpesvirus 1 infection. *Infection and Immunity* Vol. 31 N°2: 636-640, 1981.
- 123- STRAUB, O.C. The establishment of IBR-IPV virus latency in cattle following the application of an inactivated IBR-IPV vaccine. In, *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, pp: 241-249 (by Wittman, G. et al, Martinus Nejhoff Publishers, Comission of the European Communities) 1984.
- 124- STUDDERT, M.J. Comparative aspects of Equine herpesviruses *Cornell Vet.* 64: 94-122, 1974.
- 125- STUDDERT, M.J. Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of Equine herpesvirus type 1. *Archs. Viro1.* 77: 249-258, 1983.
- 126- STUDDERT, M.J.; BLACKNEY, M.H. Equine herpesviruses: on the differentiation of respiratory from foetal strains of type 1. *Aust. Vet. Journal* Vol. 55: 488-492, 1979.
- 127- STUDDERT, M.J.; FITZPATRICK, D.R.; HORNER, G.W.; WETZBURY, H.A.; GLEESON, L.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of some Equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates. *Aust. Vet. Journal* Vol. 61 N°11: 345-348, 1984.
- 128- STUDDERT, M.J.; SIMPSON, T.; ROIZMAN, B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of Equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* 214: 562-564, 1981..

- 129- THIRY, E.; DUBUISSON, J.; PASTORET, P. Patogenia, latencia y reactivación de las infecciones provocadas por Herpesvirus. Rev. Sci. Tech. Off, Int. Epiz. Vol. 5 N°4: 829-836, 1986.
- 130- TURTINEN, L.W.; ALLEN, G.P. Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1. J. Gen. Virol. 63: 481-485, 1982.
- 131- TURTINEN, L.W.; ALLEN, G.P.; DARLINGTON, R.W.; BRYANS, J.Y. Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. Am. J. Vet. Res. Vol 42. N°12: 2099-2104, 1982.
- 132- WALLIS, C.; MELNICK, J.L. Herpesvirus neutralization: the role of complement. The Journal of immunology Vol. 107 N°5: 1235-1242, 1971.
- 133- WESTERFIELD, C.; DIMOCK, W.W. The pathology of equine virus abortion. J.A.V.M.A Vol CIX N°833: 101-111, 1946.
- 134- WHALEY, J.M.; ROBERTSON, G.R.; DAVISON, A.J. Analysis of the genome of equine herpesvirus type 1: arrangement of cleavage sites for restriction endonucleases Eco RI. Bgl I and Bam HI. J. Gen. Virol 57: 307-323, 1981.
- 135- WILDY, P. Herpes: history and classification. In, The Herpesviruses pp: 1-25 (AS Kaplan ed. New York, Academic Press) 1973 .
- 136- WILKS, C.R.; COGGINS, L. Immunity to equine herpesvirus type 1 (rhinopneumonitis):in vitro lymphocyte response. Am. J. Vet. Res. 37: 487-492, 1976.
- 137- YEARGAN, M.R.; ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Rapid subtyping of equine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 21: 694-697, 1985.

- 138- YUROV, K.P.; SOLOGUB, V.K. Application of the hemagglutination test for diagnosis of equine herpesvirus 1 infection
In, Proc. of the 4th Int. Conf. on Eq. Inf. Dis.: 43-48,
Lyon 1976.
- - - - -
- 

Artículo 11º) La Facultad no se hace solidaria de las
opiniones vertidas en una Tesis.-