

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA,
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS.

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR HERPES VIRUS
BOVINO 1 (subtipo 1. 1) EN CONEJAS GESTANTES.**

Autor: VALERA Alejandro Rafael.

Directoras: ECHEVERRIGARAY Maria Elisa.
GALOSI Cecilia Mónica.

Miembros del jurado:

Dr. Schudel Alejandro A.

Dr. Odeon Anselmo.

Dr. Perfumo Carlos.

2007

AGRADECIMIENTOS

A la Cátedra de Virología y a la Facultad de Ciencias Veterinarias por facilitarme el lugar de trabajo para realizar esta tesis y la ayuda económica necesaria para llevarla a cabo

A la Dra. María Elisa por la confianza y la amistad que depositó siempre en mí.

A Gabriela Echeverría que supo enseñarme a trabajar y me brindó su colaboración y amistad.

Al Profesor Raúl Lacchini por facilitarme los conejos y las instalaciones del criadero de la Cátedra de Introducción a la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

Al “Tano Grattoni” por su ayuda incondicional en el manejo de los animales.

A las Dras Alejandra Quiroga y Adriana Massone por su colaboración en el análisis de los preparados histopatológicos.

A Santiago Corva por el aporte en el análisis estadístico.

A todas las personas que de alguna manera directa o indirectamente estuvieron involucradas en este trabajo. Muchas gracias.

A Cecilia Galosi muy especialmente por su interés, por su amistad, su compañerismo, y por saber guiarme en este trabajo que sin su empuje no hubiera sido posible.

Gracias Ceci.

INDICE

ABREVIATURAS-----	V
RESUMEN-----	VIII
1. INTRODUCCIÓN -----	2 -
1.1. Características de la familia viral-----	3-
1.2. Morfología y propiedades físico químicas-----	4 -
1.3. Organización del genoma -----	6 -
1.4. Replicación -----	8 -
1.5. Herpevirus Bovino 1-----	11 -
1.5.1- Antecedentes -----	11 -
1.5.2- Composición y propiedades físico-químicas -----	13 -
1.5.3- Ciclo de replicación-----	15 -
1.5.4- Latencia -----	17 -
1.5.5- Propiedades biológicas-----	18 -
1.5.6- Signos clínicos-----	19 -
1.5.7- Patogenia -----	22 -
1.5.8- Epizootiología-----	23 -
1.5.9- Respuesta inmune-----	24 -
1.5.10- Profilaxis y control-----	26 -
1.5.11- El conejo como modelo experimental en el estudio del BHV-1 ---	29 -
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS-----	33 -
2.1 Hipótesis de trabajo -----	34 -
2.2 Objetivo general-----	34 -
2.3 Objetivos parciales: -----	34 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS-----	35 -
3.1 Animales de experimentación: -----	36 -
3.2 Virus y células -----	37 -
3.3 Infección experimental -----	38 -
3.3.1 Método por trepanación (T) de seno paranasal (Metodo Brawn) ---	38 -
3.3.2 Método de inoculación directa de narinas por instilación nasal ---	40 -
3.4 Observación clínica. -----	42 -

3.5 Muestreo de los animales	43
3.5.1 Muestras para serología	43
3.5.2 Muestras para aislamiento viral	43
3.5.3 Muestras para reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
3.5.4 Muestras para estudios histológicos	44
3.6 Estudios serológicos	44
3.6.1 Técnica de virusneutralización (VN)	44
3.6.2 Técnica de ELISA	45
3.7 Aislamiento viral	45
3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
3.9 Estudios histopatológicos	47
3.10 Análisis de los datos	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Infección experimental	50
4.1.1 Método por trepanación de seno paranasal (Metodo de Brown)	50
4.1.2 Observación clínica	50
4.1.3 Análisis serológico por VN y ELISA	51
4.1.4 Aislamiento viral y PCR	52
4.2 Infección experimental. Segunda experiencia	52
4.2.1 Método de inoculación directa de narinas por instilación nasal(N)	52
4.2.2 Observación clínica	52
4.2.3 Análisis serológico por ELISA	57
4.2.4 Aislamiento viral	63
4.2.5 PCR	68
4.2.6 Estudios histológicos	69
5. DISCUSION-CONCLUSIONES	78
Conclusiones	88
6. BIBLIOGRAFIA	89

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

μl: microlitro.

<: menor que.

>: mayor que.

α: Alfa.

ABTS: azinodietilbenzotiazol-sulfonato

Ac: anticuerpo.

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

ADN: Acido desoxiribonucleico.

Ag: antígeno.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

AT: a término.

AV: aislamiento viral.

β: Beta

BHV: Herpesvirus bovino.

BHV-1.1: Herpesvirus bovino-1.1

BHV-1.2: Herpesvirus bovino-1.2

BHV-1: Herpesvirus bovino-1

BHV-5: Herpesvirus bovino-5.

BT: cornetes nasales

CI: cuerpos de inclusión.

cm²: centímetros cuadrados.

Da: Daltons.

DICT50%: dosis infectante cultivo de tejidos 50%.

DO: densidad óptica.

dPI: días post infección

dprs: días pre servicio

dps: días post servicio.

ECP: efecto citopático.

G + C: Guanina mas Citosina

g: gramo.

gp: glicoproteína.

h: hora.

HE: hematoxilina y eosina.

HSV: herpes simplex humano

IBR: rinotraqueítis infecciosa bovina.

ICTV: Comité internacional de taxonomía de virus.

Ig: inmunoglobulina.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM. Inmunoglobulina M.

IHQ: inmunohistoquímica.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS (continuación)

IMC: inmunidad mediada por células.
IN: instilación nasal
IPB: balanopostitis infecciosa.
IPV: bulbo vaginitis pustular infecciosa.
ITF: interferón.
Kbp: pares de Kilobases.
LA: Los Ángeles (cepa prototipo de BHV-1.1).
LB: linfocitos B.
LT: linfocitos T.
M: molar.
MDBK: Madin Darby Bovine Kidney.
MEM: medio esencial mínimo.
MEM-M: MEM de mantenimiento.
mg: miligramo.
min: minutos.
ml: mililitro.
mm: milímetros.
ND: no determinado.
NK: células "natural killer".
nm: nanómetros.
pb: pares de bases.
PBS: buffer fosfato salino.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PI: post infección.
PIn: periodo de incubación.
PK: riñón de cerdo.
PM: peso molecular.
Pmn: polimorfo nucleares neutrófilos.
prs: pre servicio.
RK: riñón de conejo.
S: unidad Sberberg.
SFB: suero fetal bovino.
SNC: sistema nervioso central.
SNP: sistema nervioso periférico.
T: trepanación.
Ta: temperatura ambiente.
TK: timidina quinasa
Tu HV: tupai herpesvirus
UI: unidades internacionales.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS (continuación)

UL: región única larga.
US: región única corta.
UV: ultravioleta.
V: voltios.
VN: virus neutralización.
 γ : Gamma

RESUMEN

La infección natural de bovinos por Herpesvirus 1.1 (BHV-1.1) se manifiesta por signos oculares (conjuntivitis), respiratorios (rinotraqueitis), digestivos, nerviosos y genitales (vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis). La infección en hembras preñadas puede resultar en aborto que suele ocurrir entre el 4º y 7º mes de gestación; las lesiones fetales están usualmente enmascaradas por el estado autolítico del feto. El modelo conejo fue utilizado en varias oportunidades para reproducir infección neurológica por BHV-5. Este trabajo se desarrolló con el objetivo de estudiar las respuestas en conejas gestantes, ante la infección experimental con BHV-1.1 en diferentes períodos de la gestación para que los datos resultantes puedan ser utilizados para la mejor comprensión de la infección en el bovino. Se describe un nuevo método de infección experimental que desencadena manifestaciones clínicas, patológicas y respuesta inmune como resultado de la infección. Se inocularon conejas en diferentes periodos de gestación, se recuperó virus a partir de hisopados nasales de los animales que desarrollaron signos clínicos, se observaron lesiones histopatológicas en las muestras analizadas, se demostró la respuesta inmune humoral inducida y se detectó ADN viral a partir de placentas de los animales gestante infectados. Los resultados obtenidos valorizan el modelo experimental conejo para estudiar la infección abortigénica por BHV-1.1.

Palabras claves

Herpesvirus bovino 1.1

Infección abortigénica

Modelo experimental conejo

EXPERIMENTAL INFECTION BY BOVINE HERPESVIRUS 1.1 IN PREGNANT RABBITS.

SUMMARY

Natural infection with Bovine herpesvirus 1.1 (BHV-1.1) is accompanied by several clinical manifestations in cattle including conjunctivitis, respiratory and genital diseases, and occasionally abortion between 4-7 month of gestation. Fetal lesions are generally not well visualized due to autolysis present in the fetus. The rabbit model has been used widely for the establishment of BHV-5 neurological acute infection. This study was conducted in order to analyze the response to experimental infection with BHV 1.1 in pregnant rabbits during different periods of gestation. The data obtained could be useful for a mayor understanding of the infection in cattle. We describe a new method of experimental infection which reproduces clinical and pathological manifestations as well as immune response resulting from the infection. Rabbit were inoculated in different periods of gestation. Virus was recovered from nasal swabs from those animals which developed clinical signs. Histopathological lesions were found in the analyzed samples. The induced humoral immunoresponse was demonstrated and viral DNA was detected from the placenta of infected animals. These results highlight the experimental rabbit model for the study of abortigenic infection by BHV-1.1

Key words

Bovine herpesvirus 1-1

Abortigenic infection

Rabbit experimental model

INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR HERPES VIRUS
BOVINO 1 (subtipo 1. 1) EN CONEJAS GESTANTES.

VALERA Alejandro Rafael.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA VIRAL

La familia *Herpesviridae* está constituida por un grupo de virus muy difundido en el reino animal, todos ellos morfológicamente similares y la mayoría capaces de inducir infecciones latentes, es decir que pueden reactivar luego de meses o años de producida la infección primaria. La reactivación es generalmente intermitente y se encuentra asociada a condiciones de estrés e inmunodepresión. (1)

De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (2, 3, 4) y teniendo en cuenta sus propiedades biológicas, los herpesvirus pueden ser clasificados dentro de tres subfamilias, denominadas Alpha, Beta y Gammaherpesvirinae que incluyen a sus respectivos géneros. Esta clasificación esta basada en el tropismo celular, crecimiento en cultivos celulares, tipo de efecto citopático (ECP) y sitio de latencia. En general se demostró que estas propiedades se correlacionan con sus propiedades moleculares, sin embargo se encontraron excepciones que han hecho que muchos herpesvirus hayan sido actualmente reclasificados.

Los Alphaherpesvirus poseen un amplio rango de hospedadores naturales, producen rápido ECP lítico y establecen latencia principalmente en las neuronas y ganglios sensoriales. Comprende los generos Simplexvirus (ej: Herpes simples humano 1 [HSV-1]), Varicellovirus (ej: virus de la Varicela Zoster, Herpesvirus bovino 1 y 5, Herpesvirus equino 1), Iltovirus (ej: Herpesvirus del gallo 1 o virus de la Laringotraqueitis aviar) y Mardivirus (ej: Herpesvirus del gallo 2 y 3 o virus de la enfermedad de Marek).

Los Betaherpesvirus poseen rango de hospedadores restringido, replican lentamente en cultivos celulares con baja patogenicidad aunque inducen al agrandamiento de las células infectadas (citomegalia) y establecen latencia preferentemente en las células linforreticulares y otros órganos. La integran los géneros Citomegalovirus (ej: Citomegalovirus humano), Muromegalovirus (ej: Citomegalovirus murino) y Roseolovirus (ej: Herpesvirus humano 6).

Los Gammaherpesvirus son caracterizados por su estrecho rango de hospedadores. Replican *in vitro* en células linfoblásticas y fibroblásticas en donde también establecen latencia. La adaptación en linfocitos LB y LT los hace potencialmente oncogénicos. Comprende los géneros Linfocriptovirus (ej: Virus Epstein Barr) y Rhadinovirus (ej: Herpesvirus saimiri). (3, 5, 6)

1.2. MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Las propiedades de las partículas de herpesvirus están determinadas por:

- a) ADN lineal de doble cadena capaz de codificar entre 30-35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada. El mismo se presenta enrollado alrededor de una estructura proteica toroidal central.
- b) Cápside icosaédrica, simetría cúbica constituida por 162 capsómeros (12 pentaméricos y 150 hexaméricos).
- c) Capa amorfa fibrosa y asimétrica (“tegumento”), rodeando la nucleocápside, compuesta de lipoproteínas, glicoproteínas (gp) y proteínas con actividad enzimática.
- d) Envoltura externa, lipoproteica, trilaminar, con proyecciones glicoproteicas hacia el exterior (espículas o peplómeros).

- e) Virión de un diámetro total entre 150-250 nm debido a la variabilidad del espesor del tegumento y a la pleomorficidad de la envoltura.
- f) Tamaño de genoma variable, entre 124 y 235 pares de kilobases (kbp).
- g) Composición de bases de 32 a 75 G+C moles%.
- h) Relativa inestabilidad a la temperatura ambiente (T_a) y $\text{pH} < 3$ y > 9 .
- i) Rápida inactivación por los solventes orgánicos. (3, 7, 8) (Figura I)

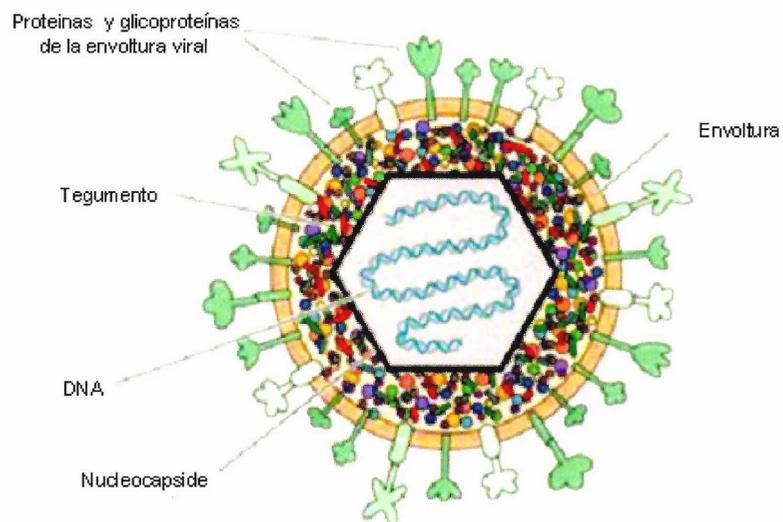


Figura I: representación esquemática de un herpesvirus. Se observa la cápside de simetría icosaédrica y las proteínas y glicoproteínas de la envoltura graficadas como proyecciones (9)

1.3. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

En relación a la estructura genómica de los herpesvirus el ADN es lineal de doble cadena de tamaño variable entre 124 y 235 kpb, cuenta con secuencias terminales e internas repetidas por lo que los pesos moleculares (PM) varían entre 80 y 150 X 10⁶ Daltons (Da). De acuerdo a la localización y presencia de estas secuencias se describen seis tipos genómicos designados de "A" a "F".

En el tipo "A" ambos extremos genómicos poseen la misma secuencia repetitiva de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) que se denominan "repeticiones terminales derecha e izquierda", el herpesvirus humano 6 y herpesvirus equino 2 pertenecen a este grupo.

El tipo "B" posee en los dos extremos una región con repeticiones directas que pueden variar en número en alguno de ellos. En este grupo se puede citar al herpesvirus ovino 2 como ejemplo.

En el tipo "C" (ej: virus Epstein Barr) en la denominada región única del genoma, existen secuencias repetidas en tramos específicos y el número de repeticiones terminales es pequeño.

El tipo genómico "D" posee una región terminal derecha y una interna de orientación invertida respecto a la anterior, que flanquean una región única corta (US) y esta zona puede invertirse con respecto a la región única larga (UL) obteniéndose dos tipos isoméricos en la progenie de una célula infectada. El herpesvirus bovino 1 y 5 (BHV-1 y BHV-5) poseen este tipo genómico (10, 11)

En los herpesvirus de tipo genómico "E" las secuencias de ambos extremos están repetidas en orientación invertida y dividen al genoma en dos partes: UL y US

cada una de las cuales consiste en única secuencia flanqueada por repeticiones invertidas. A su vez, UL y US pueden invertirse una respecto a la otra de manera que a partir de una célula infectada pueden obtenerse cuatro poblaciones isoméricas denominadas: prototipo, isómero L, isómero S e isómero LS. En este grupo se encuentra en herpesvirus bovino 2.

En los genomas de tipo "F" las secuencias de los extremos no son idénticas y no se repiten. Un representante del grupo es el Tupai herpesvirus (Tu HV) (1, 3). (Figura II)

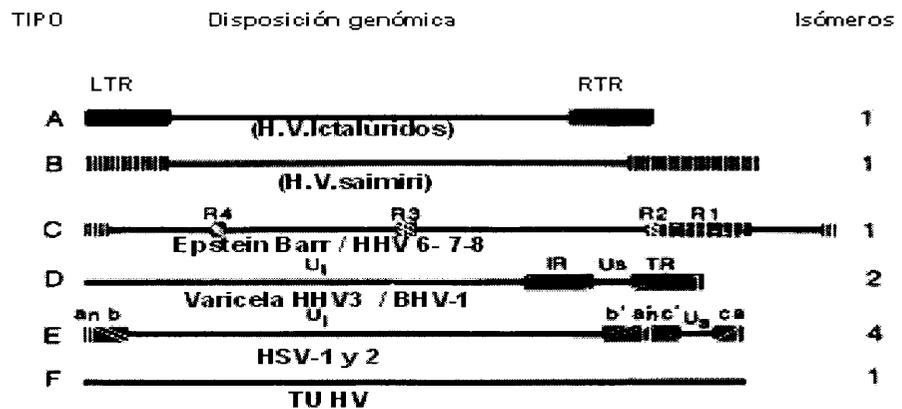


Figura II: esquema de los diferentes tipos genómicos que presenta la familia Herpesviridae. Los genomas son ejemplificados por: herpesvirus 1 de los ictalúridos (A), herpesvirus saimiri (B), herpesvirus humano 4-Epstein Barr-, 6, 7 y 8 (C), herpesvirus humano 3 y herpesvirus bovino 1 (D), herpes simplex humano 1 y 2 (E) y tupai herpesvirus (F). Las líneas horizontales representan las regiones únicas o casi únicas. U_l: región única larga; U_s: región única corta. Los dominios repetitivos se esquematizan como rectángulos y se designan como LTR: repeticiones terminales izquierdas y RTR: repeticiones terminales derechas para el grupo A; repeticiones internas R1 a R4 en el grupo C; repeticiones internas (IR) y terminales (TR) para el grupo D. Las terminaciones del genoma del grupo E consisten en dos elementos, uno contiene "n" copias de la secuencia "a" (aⁿ) próxima a la secuencia denominada "b"; el otro extremo posee una secuencia repetida "a" próxima a la secuencia denominada "c". Las terminaciones del grupo F no han sido descritas. En el grupo B el número de terminaciones en ambos extremos puede variar. (3)

1.4. REPLICACIÓN

El ciclo de multiplicación de los herpesvirus es común a todos los integrantes de la familia. De acuerdo a la subfamilia a la que pertenezcan el ciclo varía de 18 a 70 horas post infección (PI) en donde se suceden las diferentes etapas.

La primera etapa, “adsorción”, se produce en receptores específicos de la membrana de la célula huésped con intervención de las gp virales. La “penetración” puede darse por fagocitosis o más frecuentemente por fusión de la membrana plasmática con la envoltura viral. Continúa la “decapsidación” con liberación del ADN viral en el núcleo celular. Por la acción de la ARN polimerasa II de la célula huésped se inicia la transcripción del ADN viral. Se producen tres clases de ARNm, de manera secuencial y en “cascada” y estos se traducen en la biosíntesis de tres tipos de proteínas. Las primeras denominadas “ α ” o inmediatamente tempranas se caracterizan por ser fosforiladas y capaces de asociarse al ADN, son no estructurales y actúan como reguladoras. Las “ β ” o tempranas son sintetizadas “de novo” y requieren de la presencia de algunas “ α ”; son no estructurales, algunas actúan regulando la síntesis de las “ α ” y de macromoléculas celulares y además activan la síntesis del tercer tipo de proteínas (“ γ ”). Las proteínas “ γ ” o tardías son estructurales y además actúan como reguladoras inhibiendo la síntesis de las proteínas “ α ” del ciclo siguiente de replicación.

La replicación del ADN es semiconservativa bajo el modelo de círculo rodante y se produce con intervención de polimerasas específicas codificadas por el virus. Las cápsides preformadas incorporan el ADN genómico (“armado”), se asocian con

áreas alteradas de la zona interna de la membrana nuclear de la célula huésped, y salen del núcleo por brotación a través de la membrana nuclear modificada, de donde adquieren la envoltura.

La "maduración" se produce durante el paso a través del retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi.

La liberación de los viriones al medio extracelular es producida por exocitosis (descarga de virus desde la célula) o por citólisis (destrucción celular). (1, 7, 12,13)
(Figura III)

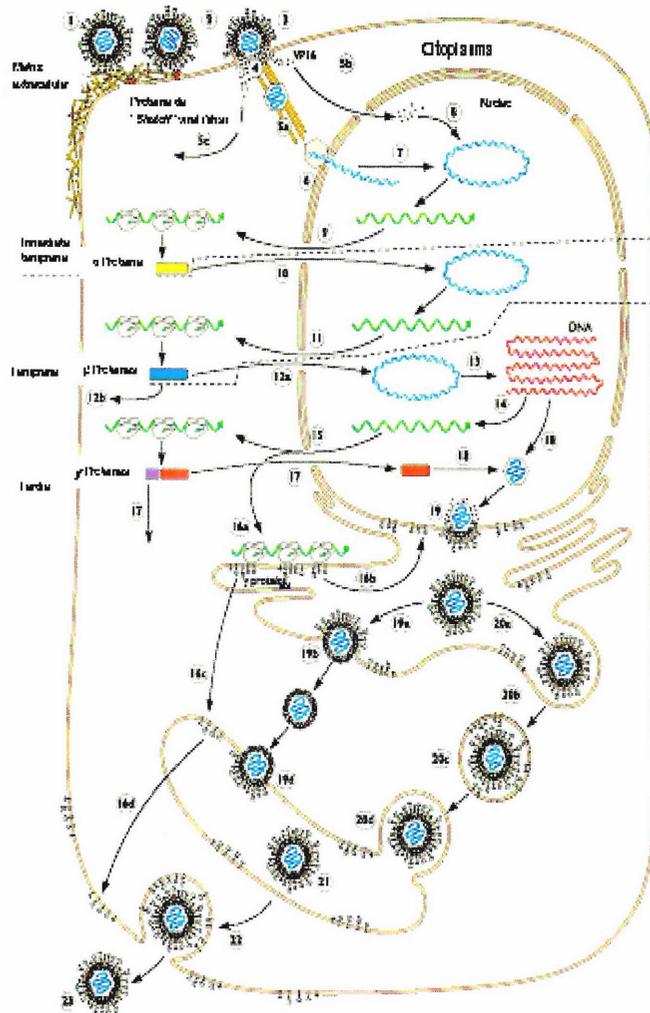


Figura III: mecanismo de replicación de un herpesvirus. Glicoproteínas de la membrana viral (1). Interacción con receptores celulares (2) Fusión (3). Proteínas del tegumento y de la nucleocápside ingresan al citoplasma celular (4). Transporte de la nucleocápside (5a) y de proteínas activadoras de la transcripción (5b) hacia el núcleo. Proteínas del tegumento que permanecen en el núcleo (6). Entrada de la nucleocápside por el poro nuclear (7). Proteínas del tegumento activadoras de la transcripción (8). α ARNm son transportados hacia el citoplasma (9) donde se sintetizan las α proteínas (10) reguladoras de la síntesis del β ARNm (11) para la síntesis de las β proteínas (12). Inicio de la síntesis del ADN viral (13). Síntesis de γ ARNm (14) y de γ proteínas (15) estructurales. Algunas γ proteínas precursoras quedan en el retículo endoplásmico rugoso (16a), otras se localizan sobre la membrana nuclear del lado interno del mismo (16b) o son trasladadas al Aparato de Golgi para su posterior procesamiento (16c) y una vez maduras se depositan en la membrana plasmática de la célula infectada (16d). Algunas γ proteínas son transportadas hacia el núcleo para formar las cápsides y otras permanecen en el citoplasma (17). El ADN formado se empaqueta en las cápsides formadas (18) e inicia su paso a través de la membrana nuclear (19) en donde adquiere envoltura (20). Esta estructura es transportada hacia el aparato de Golgi en donde se encuentran las proteínas de envoltura maduras (21) y se completa la envoltura viral (22). La partícula viral completa (23) es transportada hacia la membrana plasmática y es liberada por exocitosis (24) (9)

1.5. HERPEVIRUS BOVINO 1

1.5.1- Antecedentes

Existen cinco tipos de herpesvirus que poseen como hospedador natural al bovino, designados como herpesvirus bovino (BHV) 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Dentro de los Alphaherpesvirus, genero Varicellovirus, se halla el BHV-1 que posee 2 subtipos: BHV-1. 1 y BHV-1. 2 diferenciables entre ellos por fragmentos en los patrones de restricción de ADN. (14, 15, 16, 17) El BHV-1.2 puede a su vez subdividirse en BHV-1.2a y BHV-1.2b. (18, 19, 20, 21, 22, 23)

El BHV-1 y BHV-5 afectan naturalmente al bovino, especie en la que según el tipo viral, provocan un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Puede observarse rinotraqueítis (IBR), conjuntivitis, aborto y enteritis, principalmente cuando actúa el BHV-1.1. En caso de que la infección sea causada por el BHV-1.2 la manifestación clínica principal es la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) o la balanopostitis (IPB). El BHV-5 (anteriormente denominado BHV-1.3) es el mayor responsable de encefalitis. (24, 25, 26, 27)

La IBR es una enfermedad de distribución mundial, conocida en Estados Unidos desde 1954 (28, 29, 30) y se atribuyó su etiología a un agente viral. (31) La primera publicación sobre IBR se remonta al año 1954 (32) y el aislamiento del agente etiológico data del año 1956. (33) Mc Kercher (1973) sugiere que el virus ingresó a Norteamérica en 1930, años más tarde se reconoció la enfermedad respiratoria por BHV-1 en Europa. (34) La IPV se remonta a la mitad del siglo pasado y la información indica que existió antes que la IBR aunque el agente se aisló recién en 1958. (23, 25, 35, 36) En 1961 se clasificó al agente etiológico dentro de la familia Herpesviridae. (34, 36) Paralelamente se observaron a nivel mundial

brotos epizooticos de meningoencefalitis y se designó al agente causal como BHV-1 subtipo 3 el que posteriormente fue reclasificado y designado como BHV-5. (3, 27, 28)

La primera vez en que se observó sintomatología compatible con IBR en Argentina fue en 1959. En 1971 se realizó el primer aislamiento del virus. (37) En la década del 80 se observaron brotes compatibles con meningoencefalitis y existen datos de hasta 100% de mortalidad en animales jóvenes. (38, 39, 40) En 1995 se caracterizaron las cepas argentinas por sus patrones de restricción de ADN. (16,17) Diferentes estudios serológicos realizados indican una alta proporción de animales reactivos a esta virosis. (41, 42, 43) La prevalencia en Argentina es del 97,68 %, siendo en cada establecimiento del 45,5 %. (44) Los índices de prevalencia aumentan progresivamente con la edad de los animales. (41) Relevamientos realizados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) determinan seroprevalencias de 21- 56 % para la provincia de Corrientes, 17-65% para la La Rioja y 80 y 70-82% para las localidades de Pergamino y Olavarria en la provincia de Buenos Aires, respectivamente. (43)

Las manifestaciones clínicas observadas son: oculares, IBR, digestivas, nerviosas, IPV e IPB y abortos. (45, 46) El síndrome neurológico, que es observado principalmente en bovinos jóvenes (47, 48) fue informado en varias oportunidades en Argentina (38, 42, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55). Actualmente se conoce que esta relacionado con el neurotropismo de la cepa de BHV-5 actuante. (56, 57, 58)

1.5.2- Composición y propiedades físico-químicas

La molécula de ADN lineal de doble cadena es de aproximadamente 135-140 kpb y presenta un contenido de G+C del 72%. Las pequeñas variaciones observadas por estudios realizados con enzimas de restricción obedecen a particularidades propias de cada cepa. No se ha observado una estricta correlación entre el patrón de restricción enzimática y las manifestaciones clínicas. (26, 59, 60, 61, 62) Las longitudes de las repeticiones invertidas y de US son cepa específica y explican en parte las variaciones del PM de los ADN. (60, 63, 64)

La organización del genoma corresponde al grupo "D" de herpesvirus y se divide en una sección UL de 102-104 kpb y una US de 10.5 a 11 kpb flanqueadas ambas por repeticiones invertidas internas y terminales. Como resultado de la habilidad del segmento US de invertir respecto a la región UL, se presentan dos isómeros de ADN. Wyler (1989) determinó que en el extremo terminal derecho de aproximadamente el 10% de ADN viral transporta una "cola" de ADN celular indicando la frecuente recombinación entre el ADN viral y celular. (3, 36, 63, 65, 66)

La cápside icosaédrica de 162 capsómeros de 12 nm de largo le confiere a la nucléocápside un diámetro variable entre 95-110 nm.

El tegumento y la envoltura lipoproteica hacen que el virión sea pleomórfico y de 120-300 nm de diámetro. (3, 63)

La densidad de flotación del virus es de 1.21 g/ml en gradiente de sacarosa 20-65 %, 1.22 g/ml en tartrato de potasio y 1.730g/ml en cloruro de cesio y se correlaciona con el contenido de G+C. El coeficiente de sedimentación es de 1680-1830 S y el PM es $\sim 96 \times 10^6$ Da. (36, 60, 63, 66)

Las partículas virales permanecen viables cuando son conservadas a -70°C y suele observarse pérdida de título viral a 4°C luego de 30 días. El virus se inactiva a Ta en 50 días y a 56 °C lo hace en 20 min. Pierde infectividad luego de 24 h de exposición al éter, acetona, alcohol etílico, requiriéndose mayor tiempo para la inactivación por formalina. Pierde actividad a pH < 6 y permanece estable entre pH 6 y 9.

Como todos los herpesvirus el genoma del BHV-1, codifica para aproximadamente 70 proteínas de las cuales solo 33 son estructurales (13 asociadas a la envoltura, 14 a la nucleocápside y 6 aún no caracterizadas). Dentro de las proteínas de envoltura se encuentran las gp que también aparecen en la superficie de las células infectadas. (67, 68) Estas gp revisten importancia en la unión del virus a los receptores celulares, como blanco de los anticuerpos (Ac) neutralizantes y de los LT citotóxicos (69, 70, 71); así también se le reconocen propiedades hemaglutinantes *in vitro*. (72)

Actualmente esta aceptado que el genoma de BHV-1 codifica para 11 gp denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM y gN. (13, 59, 69, 73, 74) Las diferentes gp son diferenciadas por Ac monoclonales. (13, 75, 76) Las tres gp denominadas mayores (gB, gC y gD) se consideran importantes en la unión del virus con los receptores celulares y desencadenan la respuesta inmune en el organismo huésped. (77, 78).

La gB juega un rol muy importante en la propagación del virus, interviene en la penetración celular e interfiere con proteínas celulares responsables del ECP ocasionado por la infección con el BHV-1. (79)

La gC actuaría como responsable de la unión del virus a receptores similares a la heparina sobre la superficie de las células permisivas aunque no sería esencial en el ciclo de replicación, lo que indicaría la existencia de mecanismos alternativos intervinientes en la unión virus-célula. (79)

La gD es la responsable de la adsorción viral y fusión celular (80), penetración del virus en la célula huésped (81, 82) y se considera que es la más importante involucrada en la neutralización. (83)

Tanto la gC como la gD están fuertemente relacionadas a la citólisis mediada por Ac dependientes del complemento. (59, 77, 81, 84, 85, 86)

La gE se encuentra estrechamente relacionada a la virulencia ya sea en el huésped natural como en el experimental (87) demostrándose que en el caso del BHV-5 juega un rol importante en la neurovirulencia en el sistema nervioso central (SNC) aunque no es requerida para la entrada del mismo por la mucosa olfativa. (88)

La gH, muy conservada entre los alphaherpesvirus, es esencial para la penetración a la célula huésped y para la diseminación aunque no juega papel preponderante en la fusión de la membrana celular con la envoltura viral. (81, 82)

1.5.3- Ciclo de replicación

En una primera etapa se produce la “adsorción” de la partícula viral seguida de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática gracias a la mediación de algunas gp. Sin embargo el virus no penetra la membrana celular sino que accede al interior de la célula a través de una invaginación que se desarrolla cerca del área de fusión y que posteriormente se abre hacia el citoplasma.

Se desencadenan entonces cuatro eventos sucesivos: 1) adhesión a la membrana célula, 2) fusión, 3) perforación y penetración, 4) difusión y transporte intracelular de la cápside y el tegumento hacia la membrana nuclear. (13, 89, 90)

Posteriormente, en los poros nucleares ocurre la decapsidación y el ADN que es liberado en el interior del núcleo se circulariza. (4)

Una vez en el núcleo comienza la transcripción de genes de manera secuencial y en cascada por acción de la ARN polimerasa II de la célula hospedadora y a varias proteínas del tegumento que inhiben la síntesis de macromoléculas celulares. (61)

Primeramente se transcriben y traducen genes virales que codifican para las proteínas inmediatamente tempranas (α) denominadas BICP0, BICP4 y BICP22, quienes inducen la transcripción y traducción de proteínas tempranas (β) como DNA polimerasa y timidina quinasa (TK). Estas últimas intervienen en la replicación del genoma y en la inducción de la síntesis de las proteínas estructurales del virión (proteínas tardías o γ).

En el núcleo sucede el ensamble entre el genoma (sintetizado a través del sistema de círculo rodante) y la nucleocápside. Esta última adquiere envoltura cuando pasa a través de la membrana nuclear y termina su maduración al trasladarse dentro del aparato de Golgi.

Los nuevos viriones son liberados por exocitosis, por lisis celular o por fusión con células no infectadas (contigüidad directa).

El proceso desde la unión del virus al receptor celular, hasta la liberación de las nuevas partículas virales maduras abarca un lapso de 18-20 h aproximadamente. (59, 64, 91)

1.5.4- Latencia

La latencia es una propiedad común a todos los Herpesvirus. Se la define como “la persistencia silenciosa del virus en el organismo huésped, no detectable por los procedimientos virológicos convencionales y caracterizada por liberación intermitente de partículas activas”. (63)

Una vez producida la primoinfección, el virus despojado de su envoltura se desplaza a través de las prolongaciones nerviosas (vía centrípeta) a su sitio de latencia, generalmente los ganglios trigémino y sacro en donde permanece en estado de “acantonamiento”. (92)

En el estado latente la expresión del genoma viral está restringida y disminuye la expresión de los genes virales. Solo una región del genoma viral se mantiene transcripcionalmente activa en la latencia, la denominada región LAT (*Latency-Associated Transcript*) en el HSV-1 o región LR (*Latency-Related*) en el BHV-1 cuyos transcriptos se acumulan en el núcleo de la célula neuronal infectada. (36, 66, 93, 94)

El ADN del virus en estado latente se encuentra en forma episómica en las neuronas de los ganglios sensoriales. (36, 66) No se conocen exactamente los mecanismos involucrados en el estado de latencia. Tampoco se encuentra determinada totalmente la importancia del sistema inmune, sin embargo se observa que animales con niveles bajos de inmunidad específica muestran signos clínicos más severos y mayor excreción de virus en la reactivación. (63)

En las neuronas infectadas en forma latente no hay producción viral continua excepto cuando sucede el proceso de reactivación.

El estado de latencia hace que el virus se perpetúe entre la población bovina y bajo determinadas condiciones o por la acción de diversos factores como la inmunodepresión por corticoides, el estrés por parto, el transporte, etc, el virus latente reactiva, produciendo o no nueva signología clínica. El virus llega a las células epiteliales por vía centrífuga y comienza su multiplicación y reexcreción seguida por neutralización por Ac humorales o destrucción celular por acción de los LT citotóxicos. (3, 61, 95, 96)

El fenómeno de latencia reviste gran importancia epidemiológica para la población bovina ya que el virus permanece en los rodeos infectados de manera indefinida y se continúa transmitiendo a la población no expuesta al virus que se va incorporando al plantel.

1.5.5- Propiedades biológicas

Los bovinos de todas las edades son hospedadores naturales del virus. También se observaron signos respiratorios en cabras y rumiantes salvajes y vaginitis y balanitis en cerdos infectados naturalmente.

El virus fue aislado de búfalos, visones, hurones y antílopes. La infección experimental además fue demostrada en cabras, cerdos, animales salvajes (cérvidos) y, en especial, ovinos y conejos. No son susceptibles las ratas y ratones, cobayos ni embriones de pollo. (25, 28, 57, 87, 97, 98, 99, 100, 101)

Existe un amplio rango de células susceptibles *in vitro*. El virus crece en cultivos primarios de origen bovino y en líneas MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), BT (cornetes nasales), RK13 (riñón de conejo) y PK15 (riñón de cerdo). Se le

adjudica además cierto potencial oncogénico e inducción de apoptosis en células linfoides *in vivo* y en líneas celulares epiteliales. (34, 63, 94)

1.5.6- Signos clínicos

El BHV-1 está relacionado con los casos más severos de IBR y con IPV/IPB sin embargo, los dos subtipos pueden ser aislados desde ambas localizaciones. También ocurren infecciones subclínicas con BHV-1. Las infecciones genitales son locales y no dejan secuelas, la infección respiratoria se asocia con conjuntivitis, abortos, enteritis y casos de meningoencefalitis. (34, 35, 63)

Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR): es una enfermedad aguda caracterizada por un cuadro de depresión general, signos respiratorios, fiebre de hasta 42°C y se acompaña además de pérdida del apetito que lleva a disminución del peso y de la producción láctea.

Luego de un período de incubación (PIn) de aproximadamente una semana se observa intensa descarga nasal seropurulenta y conjuntivitis que puede ser confundida con la queratoconjuntivitis producida por *Moraxella Bovis*. (102) Las lesiones más comunes son rinitis necrótica, faringitis y laringotraqueobronquitis que por complicaciones bacterianas secundarias pueden desencadenar en neumonía generalizada.

Los estudios histológicos pueden revelar la presencia de cuerpos de inclusión (CI) intranucleares típicos, aunque este hallazgo no es constante. (63) En los casos severos puede sobrevenir la muerte. En el caso de enfermedad leve sin complicaciones bacterianas los signos consisten en rinitis con descarga mucoserosa.

Vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y Balanopostitis (IPB): el curso es aproximadamente de 4 días y el animal presenta fiebre, pérdida de apetito y depresión general. La signología clínica se caracteriza por la edematización de la vulva que además se presenta hiperémica, con vesículas, pústulas y úlceras. Se acompaña de descarga seropurulenta consecuencia de la infección bacteriana. Si bien las lesiones desaparecen aproximadamente a los 10 días la descarga vaginal puede persistir varias semanas.

Los machos presentan inflamación del pene y prepucio con la formación de pústulas y úlceras. Debido a las cicatrices producidas por la recomposición de las erosiones que se producen, si continúa el apareamiento de los animales, pueden observarse secuelas como la distorsión del pene o fallas en la erección. En general este tipo de sintomatología es producida por el BHV-1.2 y raramente se acompaña de infección respiratoria. (25, 28, 63, 103, 104, 105)

Meningoencefalitis: el curso de la enfermedad es de 4-5 días. Los animales presentan periodos alternados de depresión e hiperexcitación, anorexia, rechinar de dientes, incoordinación, ataxia, ceguera y puede llegar a producirse la muerte. (25, 38, 47, 63) Las lesiones histológicas consisten en áreas de malasia y meningitis no purulenta y la observación no siempre confirmada de CI intranucleares. En el caso de los animales que mueren las lesiones son más severas en cerebelo, tálamo y ganglios basales. (36, 38, 39)

Algunos autores citan la aparición de signos nerviosos sin que se noten signos respiratorios previos, sin embargo otros informan casos en los que la IBR precede a la manifestación nerviosa. (106, 107) Actualmente se sabe que la manifestación nerviosa es producida por el BHV-5 sin embargo muchos episodios de

meningoencefalitis producidos en América del Norte fueron producidos por cepas que una vez comparadas por sus patrones de restricción de ADN confirmaron ser BHV-1. (26, 108, 109)

Abortos: la infección en hembras gestantes con cepas de BHV-1. 1 pueden resultar en aborto, que suele ocurrir entre el 4º y 7º mes de gestación como consecuencia de la muerte fetal, luego de un período variable PI que oscila entre 3 a 6 semanas. En general los abortos suceden luego de hacerse evidente los signos respiratorios y pueden producirse hasta los 100 días posteriores a la manifestación IBR, sin embargo es común que también ocurra en animales que escapan a la infección respiratoria. No es posible el pronóstico del aborto; en algunos casos sólo se produce relajamiento de la vulva y vagina lo que requiere la remoción manual del feto. Puede ocurrir retención placentaria. Los cotiledones presentan lesiones degenerativas aunque no son patognomónicas. (25) La lenta propagación del virus hacia los cotiledones materno fetales dificulta la ruta de acceso del virus hacia el feto, lo que determina diferencias temporales entre la viremia materna y la infección fetal. Aunque la vía de acceso del BHV-1. 1 al feto no está del todo esclarecida, las lesiones hepáticas indican la ruta hematógica umbilical como la más frecuente. La muerte suele ocurrir 24-48 horas después de la infección fetal y la expulsión a partir del 7º día, momento en que los títulos virales en el feto decrecen. El virus puede ser aislado con altos títulos a partir de placenta, desde el 8º día PI (dPI) en bovinos inoculados experimentalmente, aún en ausencia de lesiones. (25, 110, 111) La mayoría de las lesiones fetales producidas por BHV-1.1 son usualmente enmascaradas por el estado autolítico del feto, sin embargo pueden observarse

focos blanquecinos de 1 a 3 mm de diámetro en hígado y pulmón, edema serosanguinolento perirrenal y necrosis hemorrágica de la corteza renal. La vasculitis necrosante, el edema y las hemorragias suelen ser hallazgos frecuentes en las placentas. (63, 111)

Otros signos clínicos: se han observado además mastitis, enteritis, metritis, dermatitis y tonsilitis como así también infecciones sistémicas en animales jóvenes con manifestaciones respiratorias y digestivas. (63, 102, 112, 113)

1.5.7- Patogenia

El virus penetra por la mucosa nasal, realiza su primer ciclo de replicación en las células epiteliales y se extiende por los conductos lacrimales a los tejidos oculares donde establece infección secundaria. Posteriormente se produce infección generalizada consecuencia de la viremia transitoria y diseminación neural y/o por puentes intercelulares que permite que el virus llegue al órgano blanco. (34, 47, 63)

En relación a la viremia, Fuchs y col. (1999) determinaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que el virus es transportado por los leucocitos de los animales infectados en forma aguda y subclínica. (114) Romera (2001) cita a Nyaga (1980) quien demuestra que los LT de sangre periférica unen muy pocas partículas virales marcadas radiactivamente y que no hay replicación viral en los linfocitos. Sin embargo otros autores demuestran que el BHV-1 no infecta LT CD8⁺ pero infecta LT CD4⁺ que conducen a la apoptosis de la célula contribuyendo de esta manera a la inmunodepresión del animal y a favorecer el establecimiento de la latencia. (64, 115)

A nivel respiratorio se comprobó que el BHV-1 inhibe la migración de los polimorfonucleares neutrófilos (pmn), la citotoxicidad mediada por células y la actividad de los macrófagos alveolares favoreciendo de esta manera la colonización por bacterias. (116, 117)

En el caso de las infecciones genitales el virus accede directamente al órgano blanco (mucosa de la vulva, pene y prepucio).

El transporte a través del sistema nervioso periférico (SNP) y/o por puentes intercelulares estaría dado exclusivamente en el caso de las infecciones localizadas. (63)

Con relación a la manifestación abortigénica, el virus llega al feto por vía hematógena, infecta al feto y produce la muerte del mismo (111, 118) aunque algunos trabajos mencionan que en la placenta el virus puede permanecer latente hasta 90 días sin transmitirse al feto. (51)

1.5-8- Epizootiología

El virus se elimina y es transmitido principalmente a través de secreciones respiratorias, oculares y genitales de los animales infectados o bien por medio de personas o equipos contaminados. (63) Los animales se infectan por medio de aerosoles o por contacto directo con secreciones nasales. La infección genital ocurre por contacto directo o por semen infectado. Esta última vía de infección ha hecho que muchos países posean algún tipo de legislación para la utilización de machos en inseminación artificial. (61)

El PIn es de 2-6 días dependiendo directamente de la dosis infectante y de la vía de infección. En caso de inoculaciones experimentales este tiempo es menor y

por el contrario puede llegar hasta una semana en los casos de campo. (34, 119, 120)

En casos de IBR se recupera virus de las secreciones nasales por aproximadamente 2 semanas, sin embargo se han demostrado casos de recuperación de virus de manera intermitente por 578 días. (119)

Si bien el bovino es el principal reservorio del BHV-1, deben ser consideradas además muchas especies de rumiantes salvajes, caprinos y cerdos que han demostrado seropositividad. El papel del ovino no está del todo claro y el del conejo ha sido minimizado. (63, 102)

1.5.9- Respuesta inmune

En todas las infecciones virales el hospedador que debe impedir o resolver una infección desarrolla mecanismos de respuesta específicos e inespecíficos.

En el caso de las infecciones por BHV-1 el organismo huésped no escapa a esta regla y se desencadenan varios tipos de respuesta; a) inespecífica: mediada por interferón (ITF), complemento y poblaciones celulares tales como pmn, macrófagos y células natural killer (NK); b) específica: (mediada por los LT y LB), es la respuesta humoral que interviene en la prevención y recuperación de una infección como así también de la reactivación viral. La respuesta celular también actúa en la recuperación. (61, 121)

Los virus son parásitos intracelulares obligados por lo tanto necesitan de tejidos susceptibles en el huésped para que la infección suceda, aunque si el huésped posee suficientes factores inespecíficos, puede combatir al agente infeccioso. Dentro

de estas defensas inespecíficas podemos citar: superficies epiteliales, membranas mucosas, lisozimas y cambios de pH en las mucosas, movimientos ciliares del epitelio respiratorio, etc. También existen diferentes sustancias capaces de neutralizar al virus en el suero de los animales infectados. (64) El ITF α cuyos niveles mas altos de excreción se observan entre las 36 y 72 h PIn, interviene en la modulación de la respuesta inmune, sin embargo, a pesar de que el BHV-1 es un inductor de ITF muy eficaz no es tan susceptible a él como otros virus. Los macrófagos y las células NK son también muy importantes como mecanismos de defensa debido a su capacidad de organizar la respuesta inmune específica y de producir citoquinas tempranas que inician el mecanismo inflamatorio. Las interleuquinas 1 y 6 y el factor de necrosis tumoral activan a los LT y a la llegada masiva de macrófagos. Además los macrófagos producen ITF, por la tanto poseen actividad citostática participando del fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Esta actividad citostática aparece a la semana de iniciada la infección, momento en que disminuyen los síntomas y antes de que los Ac sean detectables. Por otro lado, las proteínas tempranas producidas durante una infección viral son blanco de las células NK por lo tanto este hecho es importante para eliminar células infectadas antes de que ocurra la diseminación del virus. (121)

En relación a la respuesta inmune específica existen dos mecanismos efectores: a) mediados por productos celulares de tejidos linfoides (Ac, inmunidad humoral) y b) los mediados por linfocitos y otros tipos celulares a lo que se denomina inmunidad mediada por células (IMC). La respuesta humoral genera Ac neutralizantes a partir de la primera semana PIn y entre las 2-6 semanas se detecta

la ADCC. La respuesta de Ac es importante si se tiene en cuenta que previene la diseminación del virus de célula a célula *in vitro* y comienzan a ser detectables cuando se produce la recuperación de la infección. Los Ac neutralizantes protegen de los signos clínicos, acortan el tiempo de excreción viral pero no impiden la reactivación de virus latente. Los Ac persisten durante aproximadamente 5 años aunque esta persistencia requiere de reestimulaciones. Las inmunoglobulinas (Ig) M son las primeras que aparecen seguidas de las IgG. Los neonatos reciben Ac vía calostrual en las primeras 12 h pos parto y persisten hasta 6 meses en algunos casos. En relación a la IMC es muy importante en la resistencia del hospedador a determinados virus, especialmente a BHV-1. Sin embargo, a pesar de todos los mecanismos intervinientes en la defensa del huésped contra la infección del BHV-1, las características propias de este tipo viral impide que el sistema inmune lo elimine por completo del organismo, factor de suma importancia para comprender la epizootiología de la enfermedad. (64)

1.5.10- Profilaxis y control

La prevalencia y severidad de la infección con BHV-1 en los distintos países tienen un impacto directo en los programas de control y erradicación. (63) A pesar de ello, la propiedad de este virus de permanecer en estado latente y de hacer que el animal se convierta en un intermitente eliminador del mismo hace que en muchos casos se replantee si se desea controlar la enfermedad clínica o eliminar la infección. (105) Asimismo si se plantea como objetivo la erradicación del virus, es necesario contar con vacunas que además de proteger permitan diferenciar animales infectados de vacunados. (122) A esto se suma que con el uso de vacunas

los animales dejan de ser seronegativos, condición que se exige en muchos países para poder exportar e importar. (123)

Se debe tener en cuenta además que con la vacunación no se previene la reinfección con cepas de campo, no se puede excluir la posibilidad de recombinación de cepa vacunal y de campo (124) y la reversión a cepa virulenta y sobre todo (salvo en casos de que existan marcadores específicos) no se pueden diferenciar Ac vacunales de aquellos inducidos por infección natural. (125)

En general, en el mundo se vacuna en la mayoría de los países, excepto Suecia y Dinamarca que erradicaron la infección sin vacunación. (126)

En Argentina las vacunas se utilizan masivamente ya que es fundamental evitar la infección para minimizar las pérdidas económicas que ello ocasionaría.

Vacunas

Existen diferentes tipos de vacunas que se utilizan mundialmente: a virus vivo modificado o atenuado, a virus inactivado (mono y polivalente), y las producidas por ingeniería genética, cada una con sus ventajas y desventajas.

Vacunas atenuadas: en general se realizan con cepas de baja virulencia que son atenuadas por diferentes métodos, como por ejemplo los pasajes en cultivos celulares y el tratamiento con ácido nitroso mediante el que se obtienen cepas vacunales termosensibles. (127) Este tipo de vacunas pueden administrarse por vía parenteral o intranasal. Tienen la propiedad de inducir inmunidad similar a aquella producida en una infección natural sin embargo no se excluye la posibilidad de la producción del aborto (63, 102, 120), de que el virus se establezca en forma latente (128), de que pueda ser transmitido a la población de riesgo (129) y de que se sucedan recombinaciones entre cepas vacunales y salvajes. (127, 128, 130)

Tikoo y col (1995) afirman que las inmunizaciones con vacunas múltiples que contienen virus atenuados podrían no inducir una buena respuesta hacia los microorganismos restantes. (61) La ventaja de las vacunas atenuadas aplicadas por vía intranasal son su rápida inducción de respuesta inmune y su escaso riesgo de producción de abortos. Sin embargo las mismas cuentan con la desventaja del riesgo de reversión de la cepa vacunal a cepa salvaje (131, 132) y de la producción de reacciones adversas como por ejemplo la reducción de la producción láctea. (133)

Vacunas inactivadas: en general se producen con cepas virales inactivadas con diferentes tratamientos como por ejemplo con formalina, etilenamina, calor, luz ultravioleta. Para una buena eficiencia exigen la combinación con adyuvantes (saponinas, hidróxido de aluminio). (63, 134) Son inocuas, el virus no se establece en forma latente, no reactiva ni replica. Son seguras para su aplicación en hembras preñadas y no interfieren en la respuesta inmune de otras vacunas cuando son utilizadas en inmunizaciones múltiples. Poseen la desventaja de ser pobremente inmunogénicas, inducen inmunidad de muy corta duración y son necesarias repeticiones de vacunación para mantener un buen nivel de Ac en los animales ya que ciertos determinantes antigénicos son destruidos durante el proceso de inactivación. (42, 120, 135)

Vacunas producidas por ingeniería genética: a raíz de los problemas hallados tanto con el uso de vacunas atenuadas como inactivadas, surgen las denominadas vacunas de última generación. Dentro de este grupo se encuentran aquellas basadas en subunidades virales puras como también aquellas desarrolladas con

vectores bacterianos y víricos. (135) Poseen la ventaja de no contener virus activo y por lo tanto se evitan los efectos indeseados de las otras vacunas. Así también pueden ser utilizadas como marcadores de infección natural y/o vacunación. Constituyen una excelente alternativa para la erradicación de la infección. (68, 122, 136, 137)

1.5.11- El conejo como modelo experimental en el estudio del BHV-1

Como se expresó en párrafos anteriores, en estudios experimentales sobre BHV-1, la infección pudo ser demostrada en cabras, cerdos y ovinos. Dentro de los denominados pequeños animales de experimentación, no se ha demostrado infección en embriones de pollo y en pequeños roedores (ratones, ratas, cobayos). (28, 97, 100, 101)

El conejo, sin embargo, hasta el momento ha sido el mejor modelo experimental para el estudio de diferentes lesiones producidas por la infección con BHV (enfermedad respiratoria, abortos, conjuntivitis y meningoencefalitis). (34, 57, 87, 99, 100) Se ha utilizado para estudiar el fenómeno de latencia de BHV-1 (138, 139), las características de neuropatogenicidad de BHV-5 y para estudios comparativos de neuropatogenicidad entre cepas de BHV-1 y 5, entre otros. (140, 141, 142, 143, 144, 145, 146)

Osorio y col. (1982) utilizaron al conejo como modelo experimental para los estudios sobre BHV-4. (147)

Posteriormente Naeem y col. realizaron inoculaciones experimentales por vía intravaginal con BHV-4 para comprobar la utilidad del conejo en estudios de patogenicidad de diferentes cepas (148). En otras experiencias obtuvieron

resultados positivos de infección en fetos abortados posteriormente a la inoculación intrauterina de las madres, sin embargo los cambios histológicos no pudieron ser evaluados por el estado autolítico de los fetos (149)

El modelo conejo fue utilizado además para estudios de latencia y reactivación con HSV-1. (150).

Algunos estudios, por ejemplo, en los que se pretendió dilucidar aspectos patogénicos aun no del todo claro en la infección por BHV-1 y BHV-5, utilizaron conejos inoculándolos por instilación intranasal, otros utilizaron la vía intratecal como así también la vía intravaginal para el caso de estudios en BHV-1.2. (87).

Honda y col. en 1989 evaluaron la respuesta serológica de conejos ante la infección intratecal e intravenosa con BHV-1 sin embargo no lograron reproducir los signos clínicos (151)

Rock y Reed (1982) reprodujeron la infección con la cepa Cooper de BHV-1 inoculada por instilación del saco conjuntival de conejos adultos y posteriormente lograron la reactivación viral por el tratamiento con corticoides hasta 15 meses PI, sugiriendo al conejo como modelo experimental para el estudio de la patogenia de la infección. (144)

Recién en 1990 y con la aplicación de un método de inoculación por trepanación del seno paranasal, Brown y Field reprodujeron la infección y evaluaron la respuesta inmune humoral y celular. Señalan en su trabajo que primeramente realizaron inoculaciones por instilación intranasal pero los animales a través de estornudos eliminaban rápidamente el inóculo o bien cerraban sus fosas nasales (nostriles) de manera de impedir la entrada de la suspensión inoculada. Los autores ensayaron posteriormente con previa inyección de anestesia intramuscular y

obtuvieron similares resultados de eliminación del inóculo por mecanismo reflejo de la mucosa por lo que estandarizaron el sistema de inoculación por inyección directa (trepanación) en senos paranasales. Sin embargo los autores consideran en su discusión que esta ruta escapa a la vía natural de infección y el virus no realiza su etapa de replicación primaria en la mucosa nasal. (152) Chowdhury y col. (1997) utilizando este método de inoculación confirmaron la neuroinvasividad del BHV-5 mientras que no detectaron lesiones con BHV-1 (87)

Para el caso de estudios con BHV-1.1 en el modelo conejo el aborto sólo se menciona en la bibliografía como resultado de la infección en conejas gestantes, pero este hecho sólo es referido como un hallazgo complementario. Kelly y col. (1977) iniciaron las primeras experiencias inoculando la cepa LA por vía intravenosa, intraconjuntival e intraperitoneal en conejas adultas. Los autores reprodujeron los signos clínicos (conjuntivitis seguida de queratitis) y hallaron lesiones histopatológicas compatibles con la infección viral. En una segunda experiencia inocularon intraperitonealmente a gazapos recién nacidos que murieron como resultado de la infección sugiriendo con estos datos la aparente susceptibilidad de los neonatos al virus. (153) Lupton y col. (1979) evaluaron también este modelo experimental reproduciendo la infección en conejas adultas inoculadas por vía intradérmica y en el saco conjuntival. Asimismo observaron que conejas gestantes inoculadas por vía intramuscular, a las 40 h PI manifestaron abortos incompletos (expulsión de fetos vivos) y completos (expulsión de fetos muertos) aunque no se registraron lesiones en los tejidos fetales. (100)

Similares experiencias realizaron otros autores con otros Herpesvirus también abortigénicos utilizando por ejemplo al ratón Balb/C. Así es que varios trabajos

realizados sobre EHV-1 usando hembras preñadas en diferentes periodos de gestación e inoculadas por la vía natural de infección (intranasal) demostraron ser muy útiles para evaluar la patogenicidad, la virulencia y el endoteliotropismo de diferentes cepas. (154, 155, 156, 157, 158)

Debido a que existen pocos datos sobre cuál sería la respuesta en el conejo durante distintas etapas de la gestación, ante una infección experimental con BHV-1.1 se planteó este trabajo de tesis.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La infección experimental con BHV-1.1 en conejas gestantes desencadenará manifestaciones clínicas y respuesta inmune humoral, como resultado de la infección.

2.2 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar, con un enfoque multidisciplinario, las diferentes respuestas en conejas gestantes, ante la infección experimental con BHV-1.1 en distintos periodos de la gestación, para ser utilizado como modelo experimental en estudios comparativos con el bovino.

2.3 Objetivos parciales.

Los objetivos particulares del trabajo experimental son:

- 2.3.1.** Evaluar las manifestaciones clínicas y las lesiones en conejas gestantes.
- 2.3.2.** Evaluar la respuesta inmune humoral.
- 2.3.3.** Confirmar al BHV-1. 1 como agente etiológico de las manifestaciones clínicas y lesiones observadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación:

Se emplearon conejas de raza neozelandesa, de 5-6 meses de edad, provenientes de un criadero de la zona suburbana de la ciudad de La Plata. Los animales fueron tratados de acuerdo a la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, USA 1996) y se alojaron en un bioterio para animales convencionales.

Se conformaron tres Bloques de estudio de n =8 cada uno. (159, 160)

Bloques:

1: Conejas inoculadas a ~ 10 a 15 días previos al servicio.

2: Conejas inoculadas a ~ 15 días (2do tercio) de preñez.

3: Conejas inoculadas a ~ 22 días (3er tercio) de preñez.

Cada Bloque estuvo compuesto por tres grupos:

Grupos

a- gestantes inoculadas (n= 4).

b- gestantes no inoculadas (control negativo de infección) (n=2).

c- no gestante inoculada (control positivo de infección) (n=2).

Diseño experimental general: inoculación con BHV-1.

Bloque 1: conejas inoculadas a ~ 10 a 15 días previo al servicio.	
<u>Grupo</u>	<u>Animales</u>
a (gestantes inoculadas):	a1- a2- a3- a4
b (gestante no inoculada):	b1- b2
c (no gestantes inoculadas):	c1- c2

Bloque 2: conejas inoculadas a ~ 15 días (2do tercio) de preñez.	
<u>Grupo</u>	<u>Animales</u>
a (gestantes inoculadas):	a1- a2- a3- a4
b (gestante no inoculada):	b1-b2
c (no gestantes inoculadas):	c1- c2

Bloque 3: conejas inoculadas a ~ 22 días (3er tercio) de preñez	
<u>Grupo:</u>	<u>Animales</u>
a (gestantes inoculadas):	a1- a2- a3- a4
b (gestante no inoculada):	b1-b2
c (no gestantes inoculadas):	c1- c2

3.2 Virus y células.

Se utilizó la cepa Los Ángeles (LA) de BHV 1.1 obtenida del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Castelar (INTA), mantenida mediante pasajes en células MDBK.

Para el crecimiento de las células se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM, Gibco Cat. 41500-018) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) irradiado (Gen S.A. Cat. A15-346), glutamina (0.03 g/ml) antibióticos (penicilina 20000 UI/ml y estreptomycin 10 mg/ml) y antimicóticos (Nistatina Sigma C.N4014-50MG, 50 µg/ml). Se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

La cepa viral se inoculó con una multiplicidad de infección de 0,1 y luego de 60 min de adsorción a 37°C las células fueron incubadas con MEM suplementado con 2 % de SFB (MEM-M). Cuando se obtuvo un pasaje con ECP del 80% entre las primeras 24 h PI, los sobrenadantes fueron levantados y centrifugados a 3000 xg durante 15 min. para descartar los restos celulares, se fraccionaron y se conservaron a -70°C para su titulación.

Cinco muestras representativas de este pasaje viral fueron tituladas por el Método de Reed y Muench utilizando diluciones en base 10 de la suspensión viral. La lectura final de los resultados se realizó a los 72 h PI, se determinó la dosis infectante cultivo de tejido 50% por cada 50 µl (DICT 50%/50 µl). (161)

3.3 Infección experimental

3.3.1 Método por trepanación (T) de seno paranasal. (Método de Brown)

(Figura IV)

Bloque 1 (T-1): inoculación ~ 12 días antes del servicio

- dos animales del Grupo a (T-1-a1 y a2), uno del Grupo b (T-1-b1) y uno del Grupo c (T-1-c1)

Bloque 2 (T-2): inoculación ~ 12 días posteriores al servicio

- dos animales del Grupo a (T-2-a1 y a2), uno del Grupo b (T-2-b1) y uno del Grupo c (T-2-c1)

Se inocularon 500 µl de suspensión viral de título $10^{6,5}$ DICT50%/50µl, directamente en el seno paranasal, por trepanación, de acuerdo al método descrito en la bibliografía (152). Una alícuota del material infeccioso fue titulado posteriormente a la inoculación para corroborar el título viral.

Para los animales control negativo de infección (T-1-b1 y T-2-b1) se utilizó como inóculo idéntico volumen de sobrenadante de cultivo celular no infectado.

Bloque 3 (T-3): inoculación ~ 22 días posteriores al servicio.

No se llevo a cabo la experiencia al comprobarse la ausencia de resultados en los Bloques anteriores. Se discute en la sección correspondiente.

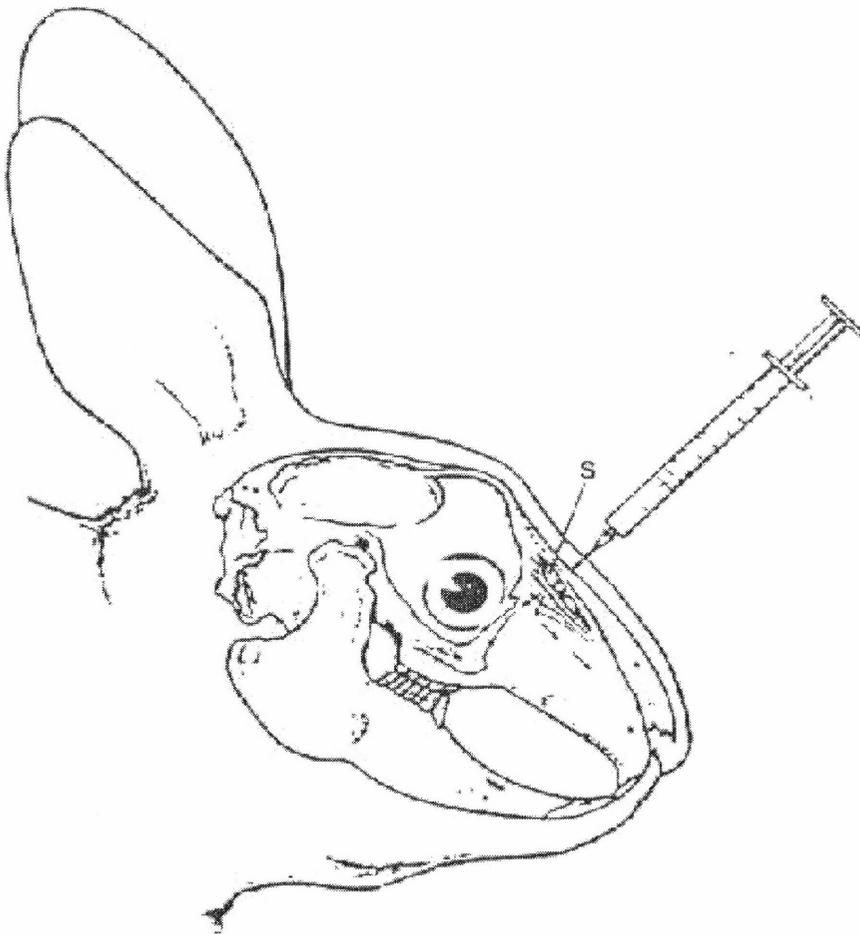


Figura IV: método de inoculación por trepanación del seno paranasal. Metodo de Brown (152)

3.3.2 Método de inoculación directa de narinas por instilación nasal (IN).

(Figuras V y VI)

Para los tres Bloques de estudio se modificó el método de inoculación. Se realizó en reemplazo del método anterior (3.3.1) por las razones que se discuten en la sección correspondiente.

Bloque 1 (IN-1): cuatro animales del Grupo a (IN-1-a1, a2, a3 y a4), dos del Grupo b (IN-1-b1 y b2) y dos del Grupo c (IN-1-c1 y c2)

Bloque 2 (IN-2): cuatro animales del Grupo a (IN-2-a1, a2, a3 y a4), dos del Grupo b (IN-2-b1 y b2) y dos del Grupo c (IN-2-c1 y c2)

Bloque 3 (IN-3): cuatro animales del Grupo a (IN-3-a1, a2, a3 y a4), dos del Grupo b (IN-3-b1 y b2) y dos del Grupo c (IN-3-c1 y c2)

Se procedió a realizar la infección experimental previa anestesia local de las narinas con Lidocaína al 10% aplicada por aspersion. Comprobada la insensibilidad de la zona, se introdujo el inóculo (250 μ l de suspensión viral de $10^{6,5}$ DICT50 %/50 μ l por cada narina) utilizando una pipeta descartable.

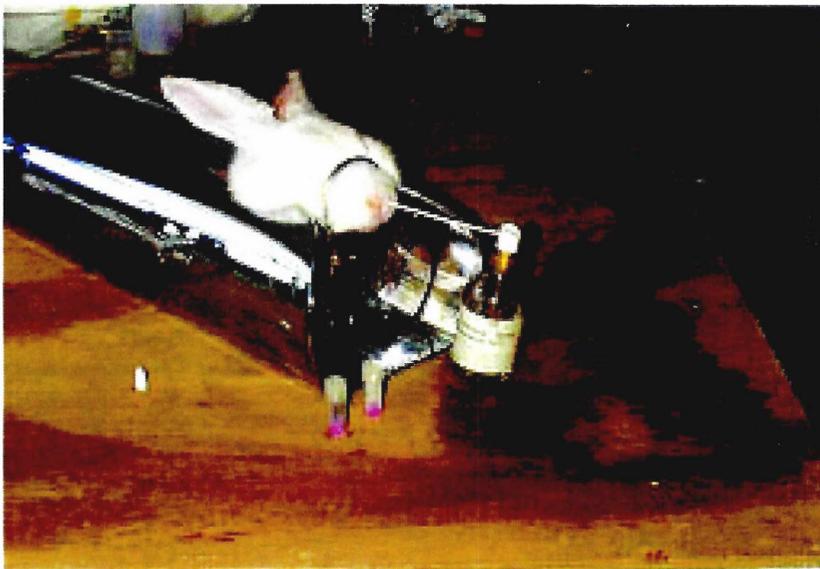


Figura V: procedimiento de anestesia de conejas con lidocaína al 10% por aspersion.



Figura VI: (a y b) procedimiento de inoculación de conejas con pipeta descartable (instilación nasal de 250 μ l de suspensión viral de $10^{6.5}$ DICT50 %/50 μ l por cada narina).

3.4 Observación clínica.

Los animales inoculados fueron observados diariamente a las 9 h y a las 17 h para constatar la aparición de signos clínicos. Se llevaron registros diarios de temperatura y de palpación gestacional a los 10-12 días post servicio. (Figura VII)

Los animales del grupo "b" (control negativo de infección) se alojaron en un ambiente separado para evitar una posible infección aerógena.

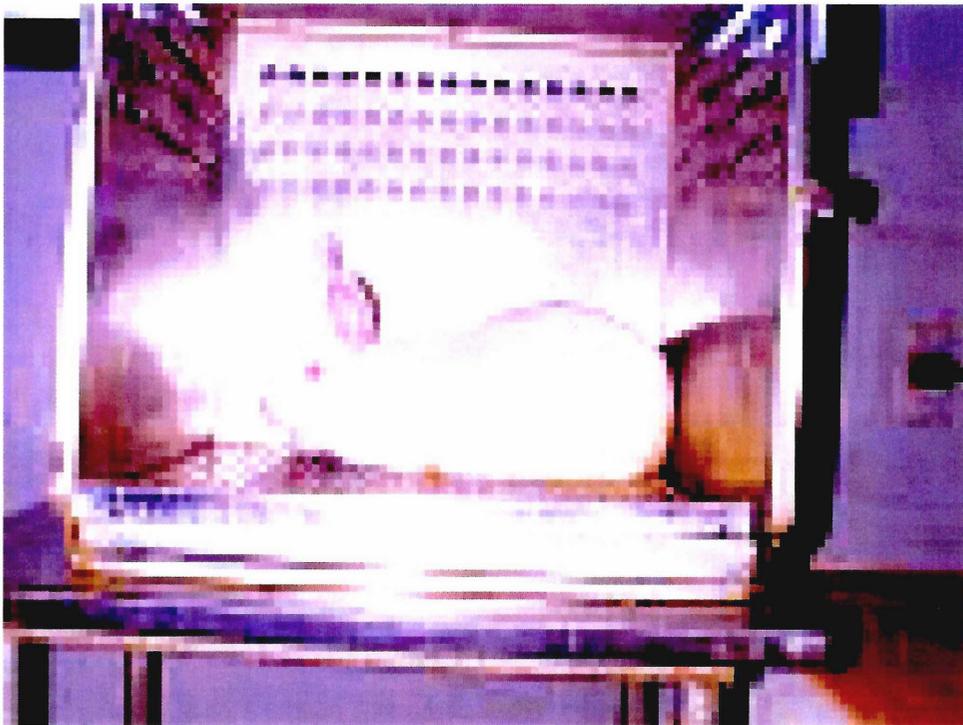


Figura VII: cajas de crianza y observación durante el experimento.

3.5 Muestreo de los animales

3.5.1 Muestras para serología

Grupos a, b y c de Bloques T-1 y 2 y Bloques IN-1, 2 y 3

Se tomaron muestras de sangre entera por punción de la vena marginal de la oreja para la obtención de suero, previamente a la infección experimental y aproximadamente cada 10 días durante un período de 90 días PI (dPI).

3.5.2 Muestras para aislamiento viral (AV)

Grupos a, b y c de Bloques T-1 y 2 y Bloques IN-1, 2 y 3

Sangre: por punción de la vena marginal de la oreja a las 48 y 72 h PI con heparina (20UI/ml), para detectar viremia.

Hisopados nasales: durante 7 dPI para el caso de los animales de los Bloques T-1 y 2 y a todos los animales con signos respiratorios hasta la desaparición de los mismos en el caso de los Bloque IN-1, 2 y 3. Los hisopos se transportaron en MEM-M inmediatamente.

Grupos a, b y c de Bloques IN-1, 2 y 3

Fetos y natimortos: se necropsiaron, se tomaron muestras de pulmón, hígado, riñón y bazo que se procesaron de acuerdo a los métodos convencionales para AV. En los casos posibles se tomaron muestras de placenta.

Conejas: Útero, pulmón, riñón y bazo en caso de muerte o necesidad de necropsia de las conejas gestantes o pos parto.

3.5.3 Muestras para reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las mismas muestras recogidas para AV fueron procesadas para PCR.

3.5.4 Muestras para estudios histopatológicos

Se tomaron idénticas muestras que las tomadas para AV de fetos, natimortos y conejas. Se fijaron en formol neutro al 10% para ser procesadas de acuerdo a las técnicas convencionales para tinción con hematoxilina y eosina (HE) y estudios inmunohistoquímicos (IHQ). (162)

3.6 Estudios serológicos

3.6.1 Técnica de virus neutralización (VN)

Se utilizó el método virus fijo-suero variable. Se usaron diluciones en base dos de cada uno de los sueros previamente descomplementados a 56°C durante 30 min. Las diluciones fueron enfrentadas a 100 partículas infectivas de la suspensión viral titulada y conservada a -70°C. Las mezclas suero-virus se incubaron durante 1h a 37°C para favorecer la unión antígeno (Ag)-Ac y se inocularon sobre monocapas preformadas de células MDBK crecidas en microplacas (Greiner Bio-One cat. 655180). Luego de una hora de adsorción a 37°C se completaron los pocillos con MEM-M y se incubaron en idénticas condiciones bajo atmósfera controlada de CO₂ hasta 72 h PI en que se realizó la lectura final. Se consideró como título neutralizante a la mayor dilución del suero que protegió a las células del efecto viral. (161)

3.6.2 Técnica de ELISA.

Se utilizó un ELISA indirecto previamente estandarizado. Se empleó un antígeno (Ag) soluble producido con células MDBK infectadas con la cepa LA de BHV-1. La solución de Bloqueo consistió en solución tamponada de fosfatos 0.141 M (PBS) con 0,05% de Tween 20 y la dilución de uso de los sueros problema se estandarizó a partir de la dilución inicial de 1/50 y en diluciones sucesivas en base 2. Como Ac secundario se utilizó suero de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich Cat nº A-9169). El sustrato consistió en ácido cítrico 0,1M, fosfato disódico 0,2M, 0,3 mg/ml de azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS, Sigma-Aldrich) y H₂O₂ al 0,01%. Los valores de densidad óptica (DO) fueron leídos utilizando un filtro de 405 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiskan Flow Laboratory, Reino Unido). Se consideraron positivos aquellos valores de la DO superiores a 2 valores promedios de DO de los sueros negativos. (163)

3.7 Aislamiento viral.

Las muestras se procesaron inmediatamente de tomadas de acuerdo a los métodos convencionales para aislamiento viral. (164)

- Los hisopados se centrifugaron a 8000 xg por 20 minutos y se conservaron los sobrenadantes a -70°C hasta su utilización.
- La sangre entera recolectada con heparina fue centrifugada a 1000 xg durante 15 min. El paquete celular se mezcló con solución de lisis de glóbulos rojos (0,85 % de NH₄Cl en 0,017M de buffer Tris pH 7,4) durante 5 min. y posteriormente centrifugada. Se conservó el paquete celular que luego fue

resuspendido con el sobrenadante recogido en la primera centrifugación. Este plasma rico en leucocitos se usó inmediatamente para AV.

- Las muestras de tejidos fueron lavadas en PBS y maceradas al 10% en MEM-M. Se realizó una primera centrifugación a 3000 xg por 10 min. para eliminar restos de tejidos groseros y una segunda centrifugación a 8000 xg durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue conservado a -70 °C y posteriormente utilizado como inóculo.

Todas las muestras procesadas se inocularon diluidas en base 10 desde 10^{-1} a 10^{-3} sobre células crecidas en microplacas de 6 pocillos (Greiner Bio-One cat. 657160). Se dejaron en adsorción por 2 horas a 37°C y se incubaron en estufa con 5% de CO₂ con MEM-M. Se realizaron tres pasajes ciegos antes de dar por negativa la muestra.

3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las muestras de sangre entera y de tejidos fueron procesadas para extracción de ácido nucleico viral utilizando un equipo comercial (Promega Cat A1120).

Se realizó la técnica de PCR mediante la metodología descrita por Alegre y col. (2006) (165) Se utilizó un par de cebadores que amplifican una región de 183 pb correspondiente al gen que codifica para TK:

TK1: 5'AGACCCCAGTTGTGAATGC-3'

TK2: ACACGTCCAGCACGAACACC-3'

La mezcla para la reacción se preparó con: 1 µl (100 ng) de cada uno de los cebadores, 5 µl de buffer de PCR 10X, 1,5 µl de Cl₂Mg 50 mM, 0,5 µl de Taq polimerasa (Fermentas Cat EP 0402), 2 µl de mezcla de dNTP (Promega Cat C 114F), 29 µl de agua destilada y 5 µl de ADN molde. El ciclado se realizó en un Ciclador Eppendorf (Mastercycler Gradient Eppendorf AG, Alemania) y consistió en un precalentamiento de 5 minutos a 99°C seguido de 1 min. a 95°C y 35 ciclos de 95°C 1min., 61,4°C 1 min. y 72°C 1 min., con una extensión final de 5 min. a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8% en buffer TBE (50 mM Tris pH 8, 50 mM ácido bórico y 1 mM de EDTA) durante 30 min. a 100 V. Los geles fueron visualizados con luz UV posteriormente a la tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos amplificados fue comparado con un marcador de peso molecular (100 pb ladder, Promega Cat G2101).

3.9 Estudios histopatológicos

Las muestras fijadas en formol fueron preparadas usando técnicas estándar para estudios histológicos. Las secciones de órganos incluidas en parafina fueron teñidas con H-E. Algunas muestras fueron procesadas para IHQ utilizando un anticuerpo monoclonal cedido por el Centro de Virología Animal Buenos Aires (CEVAN). Para el revelado de la reacción se utilizó un reactivo comercial (DakoCytomation LSAB 2 Systems, DakoCytomation, Carpintería, CA 93013 USA).

3.10 Análisis de los datos.

Los resultados de ELISA y los aislamientos virales se analizaron por análisis de varianza (Anova) y por el test de diferencia mínima significativa DMS en el caso de $p < 0.05$. Se utilizó la prueba Q de Cochran para el análisis de los signos clínicos producto de la inoculación experimental. El paquete estadístico utilizado fue Epi Info 2000. (WWW.cdc.gov/epiinfo. actualización 27/06/2007).

4. RESULTADOS

4.1 Infección experimental.

4.1.1 Método por trepanación (T) de seno paranasal. (Método de Brown)

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo previsto y con éxito en todos los casos. El título viral de la suspensión utilizada como inóculo coincidió con la DICT50 %/50 µl determinada previamente.

4.1.2 Observación clínica

Ninguno de los animales inoculados de los dos Bloques en estudio: gestantes (T-1-a1 y a2 y T-2-a1 y a2) y no gestantes (T-1-c1 y T-2-c1), presentó signos clínicos.

La temperatura en todos los casos, registrada en los 7 días posteriores a la infección varió dentro de los parámetros normales (38,6 - 40°C).

Uno de los animales del Bloque T-1 (T-1-a1) fue negativo a la palpación gestacional a los 10-12 días post servicio (dps).

La hembra registrada T-1-a2 y las dos conejas gestantes del Bloque T-2 (T-2-a1 y T-2-a2) resultaron positivas a la palpación gestacional llegando a término al parto y sin particularidades, obteniéndose 7, 8 y 5 gazapos vivos respectivamente que se desarrollaron normalmente.

Los animales T-1-b1 y T-2-b1 (controles negativos de infección) no presentaron signos clínicos y llegaron al parto a término obteniéndose 6 y 4 gazapos vivos respectivamente.

4.1.3 Análisis serológico por VN y ELISA

Las muestras de los animales de los Bloques T-1 y T-2 analizadas por la técnica de VN en algunos casos resultaron dudosas y con visible efecto tóxico hasta la dilución 1/64. La técnica de ELISA utilizada en 2do término para el análisis de los sueros permitió detectar Ac contra el BHV-1 con mayor claridad.

Los resultados obtenidos por ELISA a partir de suero de los animales inoculados se detallan en las Tablas 1 y 2.

Los sueros de los animales T-1-b1 y T-2-b1 resultaron también tóxicos para VN y negativos por ELISA.

Animal	Inoculación	Servicio	10dps (~20dPI)	20dps (~30dPI)	30dps (~40dPI)	40dps (~50dPI)	50dps (~60dPI)	60dps (~70dPI)	70dps (~80dPI)	80dps (~90dPI)
T-1-a1*	(-)	1/100	1/1600	1/3200	ND	1/1600	1/400	1/100	1/100	(-)
T-1-a2*	(-)	1/200	1/3200	1/6400	ND	1/1600	1/800	1/100	1/100	(-)
T-1-c1	(-)	1/100	1/3200	1/6400	1/6400	1/3200	1/800	1/200	(-)	(-)

Tabla 1: resultados obtenidos por ELISA a partir de los sueros correspondientes a los animales del Bloque T-1 inoculados por el método de trepanación de senos paranasales *T-1-a1 y T-1-a2 fueron inoculadas a 12 y 11 días pre servicio respectivamente; T-1-c1: hembra no gestante control positivo de infección; dps: días post servicio; dPI: días post infección; ND: no determinado (fecha probable de parto)

Animal	Inoculación	20dps (~10dPI)	30dps (~20dPI)	40dps (~30dPI)	50dps (~40dPI)	60dps (~50dPI)	70dps (~60dPI)	80dps (~70dPI)	90dps (~80dPI)	100 dps (~90dPI)
T-2-a1*	(-)	1/800	ND	1/12800	1/12800	1/1600	1/400	1/200	1/100	(-)
T-2-a2*	(-)	1/400	ND	1/6400	1/3200	1/3200	1/200	1/100	(-)	(-)
T-2-c1	(-)	1/1600	1/6400	1/12800	1/3200	1/800	1/800	1/100	(-)	(-)

Tabla 2: resultados obtenidos por ELISA de los sueros correspondientes a los animales del Bloque T-2 inoculados por el método de trepanación de senos paranasales *T-2-a1 y T-2-a2 fueron inoculadas a 13 y 12 días pos servicio (dps) respectivamente; T-2-c1: hembra no gestante control positivo de infección; dPI: días post infección; ND: no determinado (fecha probable de parto)

4.1.4 Aislamiento viral y PCR

Los hisopados nasales tomados en los primeros 7 dPI y la sangre con anticoagulante tomada a las 48 y 72 h PI resultaron negativas en ambas técnicas.

4.2 Infección experimental.

4.2.1 Método de inoculación directa de narinas por instilación nasal (IN).

Se inocularon los tres Bloques de animales de acuerdo al diseño previsto. El procedimiento se realizó exitosamente lográndose reproducir la infección respiratoria.

4.2.2 Observación clínica

A través de los registros diarios se observó que ningún animal presentó temperaturas superiores a los 40°C. En todos los casos la temperatura varió dentro de los parámetros normales (38,6 - 40°C).

El examen clínico reveló rinitis y descarga nasal en un comienzo serosa (1-2 dPI) para luego tornarse seromucosa durante períodos variables que fluctuaron entre los 5 y 7 dPI en los diferentes animales. En todos los casos se observaron rales respiratorios que persistieron desde el 2do hasta los 8 dPI. (Figura VIII) (Tablas 3, 4 y 5)

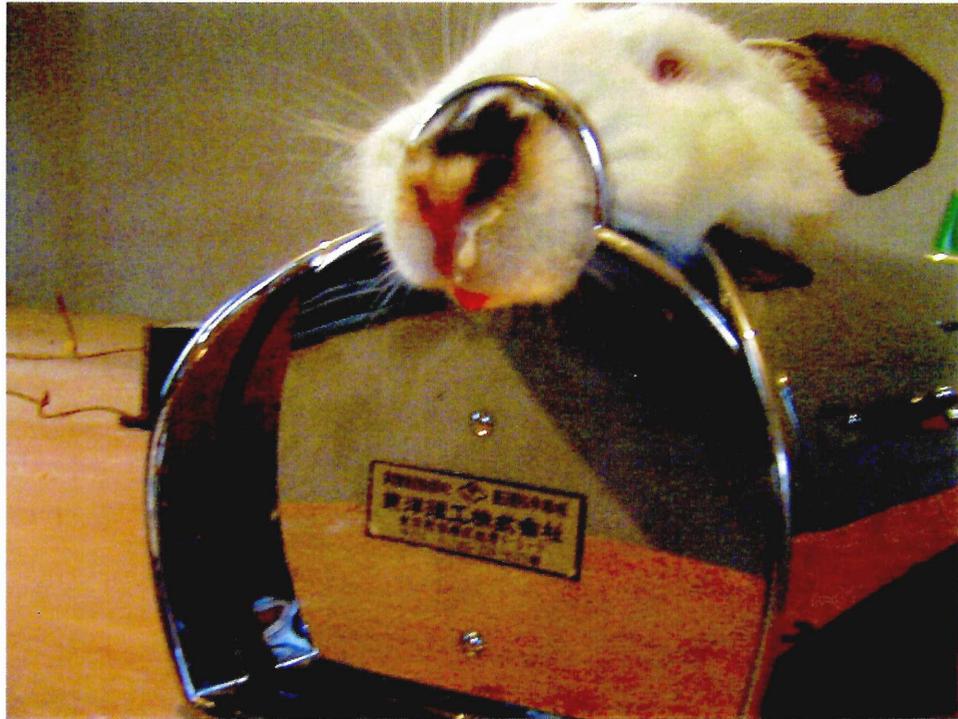
Los animales gestantes inoculados del Bloque IN-1 (IN-1-a1, a2, a3 y a4) fueron negativos a la palpación gestacional a los 10 dps. Se mantuvieron en observación por 25 días más sin que se hubiera producido el parto en ninguno de ellos.

Los animales del Bloque IN-2 denominados IN-2-a2 y IN-2-a3 murieron en el parto y 4 días previos al parto respectivamente. Un animal del Bloque IN-3 (IN-3-a2) murió a los 4 dPI mostrando signos de neumonía aguda. A los gazapos de los Bloques IN-2 e IN-3 que nacieron y sobrevivieron se les evaluó el título de Ac por la técnica de ELISA al mes del nacimiento.

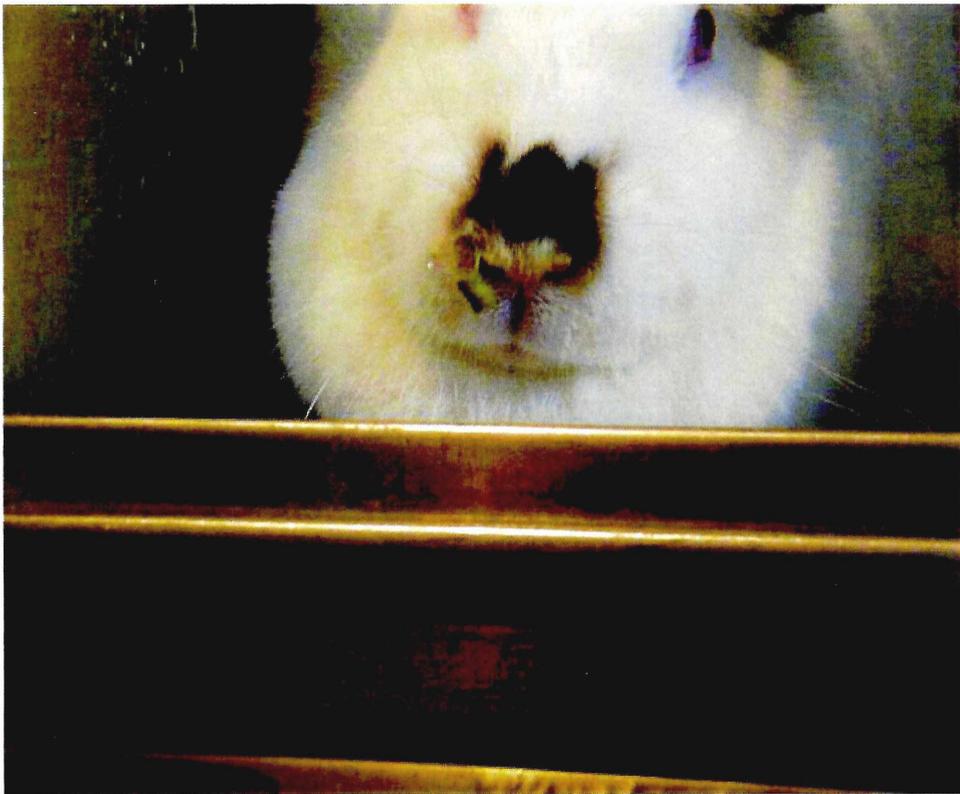
Los resultados hallados individualmente se detallan en la (Tabla 6).

Los seis animales controles negativos de infección de los tres Grupos denominados b de los tres Bloques (IN-1-b1 y b2, IN-2-b 1 y b2, IN-3- b1 y b2) no presentaron signos clínicos y llegaron al parto a término obteniéndose 5, 6, 9, 5, 4 y 5 gazapos respectivamente.

Los seis animales controles no gestantes positivos de infección (Grupos c) de los tres Bloques (IN-1-c1 y c2, IN-2-c1 y c2 e IN-3-c1 yc2) mostraron signos respiratorios y se recuperaron de la infección.



(a)



(b)

Figura VIII: (a y b) Animales con síntomas de rinitis y descarga nasal posinfección.

Animal	Inoculación (dprs)	Signos clínicos (dPI)	Aislamiento Viral
IN-1-a1	14	1-6	+ días 1 a 6
IN-1-a2	15	2-5	+ días 1 a 5
IN-1-a3	12	1-5	+ días 1 a 5
IN-1-a4	11	1-5	+ días 1 a 5
IN-1-c1	14	1-7	+ días 2 a 6
IN-1-c2	12	2-7	+ días 2 a 6

Tabla 3: resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-1 inoculados 10-15 dprs. IN-1-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dprs: días pre servicio; dPI: días post infección.

Animal	Inoculación (dps)	Signos clínicos (dPI)	Aislamiento Viral
IN-2-a1	14	2-7	+ días 2 a 7
IN-2-a2	13	1-6	+ días 1 a 5
IN-2-a3	15	2-6	+ días 1 a 6
IN-2-a4	15	2-4	+ días 1 a 4
IN-2-c1	13	1-6	+ días 2 a 5
IN-2-c2	15	1-5	+ días 2 a 5

Tabla 4: resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-2 inoculados 15 dps. IN-2-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dps: días post servicio; dPI: días post infección.

Animal	Inoculación (dps)	Signos clínicos (dPI)	Aislamiento Viral
IN-3-a1	22	2-6	+ día 2 a 5
IN-3-a2	21	1-4	+ día 1 a 4
IN-3-a3	24	1-6	+ día 1 a 5
IN-3-a4	22	2-5	+ día 1 a 5
IN-3-c1	21	1-6	+ día 2 a 5
IN-3-c2	24	2-6	+ día 2 a 6

Tabla 5: resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-3 inoculados 22 dps
IN-3-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dps: días post servicio; dPI: días post infección

Animal	Inoculación (dps)	Signos Respiratorios	Parto	Cría/Estado	Serología ELISA £
IN-2-a1	14	SI	AT Normal	1 muerte perinatal* (Figura IX) 2 natimortos* (Figura X)	
IN-2-a2	13	SI	AT Muerte del animal* #	3 natimortos* 8 neonatos normales	Negativo
IN-2-a3	15	SI	Muerte prematura del animal (4d antes del parto)* #	2 fetos* (Figura XI)	
IN-2-a4	15	SI	AT Normal	2 neonatos hipoquinéticos* 2 neonatos hipoquinéticos muertos a las 24 hs por aplastamiento.	
IN-3-a1	22	SI	AT	1 natimorto* 2 neonatos normales	1/100
IN-3-a2	21	SI	Muerte prematura del animal (6-7d antes del parto)* #	4 neonatos muertos*	
IN-3-a3	24	SI	AT Normal	5 neonatos normales	(-) a1/100
IN-3-a4	22	SI	AT Normal	1 neonato muerto por aplastamiento 5 neonatos normales 1 neonato hipoquinético*	dudoso

Tabla 6: resultados observados en los animales de los Bloques IN-2 y IN-3. dps: días post servicio * muestras y # placentas analizadas para AV, PCR y estudios histológicos. AT: a término. £ los resultados obtenidos por ELISA fueron determinados a partir del pool de sueros de los gazapos de un mes de edad.

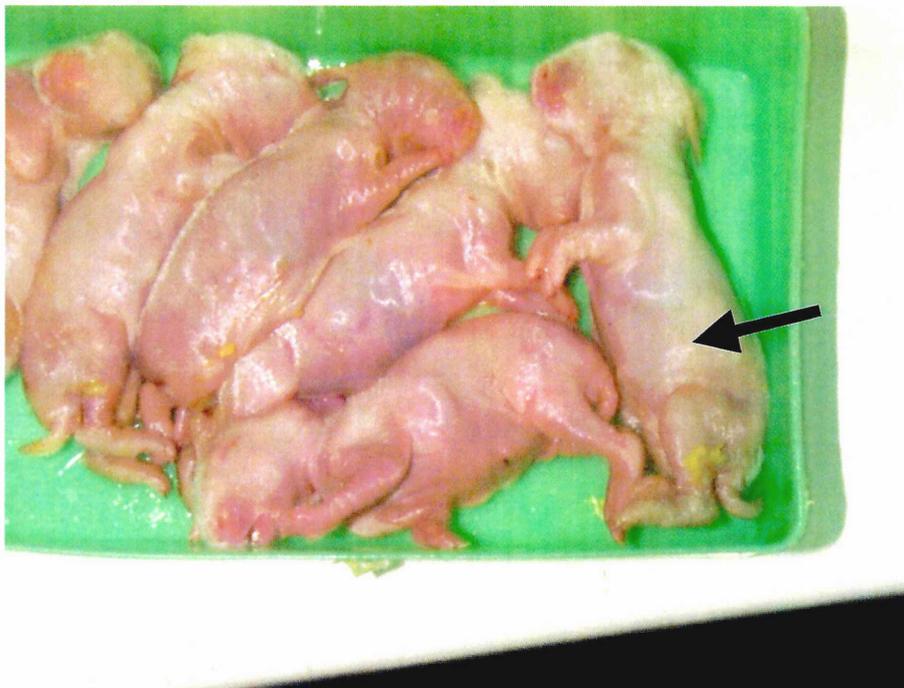


Figura IX: cinco natimortos y un gazapo nacidos muertos (↵) a término.



Figura X: necropsia de un gazapo natimorto.



Figura XI: fetos muertos, recuperados por necropsia de la coneja madre.

4.2.3 Análisis serológico por ELISA

Las muestras recogidas en esta segunda experiencia fueron analizadas todas por ELISA. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 7, 8 y 9. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos, ($p = 0,02$). Las curvas de Ac que ejemplifican los resultados se muestran en las Figuras XII, XIII y XIV.

Animal	Inoculación dprs	20-25 dPI	30-35 dPI	40-45 dPI	50-55 dPI	60-65 dPI	70-75 dPI	80-85 dPI	90-95 dPI
IN-1-a1	14	1/3200	1/12800	ND	1/800	1/400	1/200	1/200	(-)
IN-1-a2	15	1/6400	1/6400	ND	1/800	1/200	1/200	(-)	(-)
IN-1-a3	12	1/12800	1/12800	ND	1/3200	1/800	1/200	(-)	(-)
IN-1-a4	11	1/3200	ND	ND	1/1600	1/400	1/400	(-)	(-)
IN-1-c1	14	1/6400	1/12800	1/6400	1/800	1/400	1/100	(-)	(-)
IN-1-c2	12	1/6400	1/6400	1/3200	1/800	1/800	1/400	1/100	(-)

Tabla 7: técnica de ELISA. Resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-1 inoculados 10-15 dprs. IN-1-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dprs: días pre servicio; dPI: días post infección; ND: no determinado (fecha probable de parto)

Animal	Inoculación dps	10dPI	20dPI (~parto)	30dPI	40dPI	50dPI	60dPI	70dPI	80dPI	90 dPI
IN-2-a1	14	1/800	ND	1/12800	1/6400	1/1600	1/400	1/100	(-)	(-)
IN-2-a2	13	1/800	ND	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IN-2-a3	15	1/200	ND	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IN-2-a4	15	1/100	ND	1/6400	1/1600	1/1600	1/200	1/200	(-)	(-)
IN-2-c1	13	1/200	1/3200	1/6400	1/3200	1/800	1/800	1/200	1/100	(-)
IN-2-c2	15	1/400	1/6400	1/25600	1/6400	1/1600	1/800	1/100	(-)	(-)

Tabla 8: técnica de ELISA. Resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-2 inoculados ~ 15 días post servicio (dps). IN-2-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dPI: días post infección; ND: no determinado (fecha de parto)

Animal	Inoculación dps	10dPI (~parto)	20dPI	30dPI	40dPi	50dPi	60dPi	70dPI	80dPI	90 dPI
IN-3-a1	22	ND	1/800	1/6400	1/3200	1/800	1/800	1/100	(-)	(-)
IN-3-a2	21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IN-3-a3	24	ND	1/3200	1/12800	1/3200	1/1600	1/400	1/100	1/100	(-)
IN-3-a4	22	ND	1/3200	1/12800	1/6400	1/1600	1/200	1/100	(-)	(-)
IN-3-c1	21	1/400	1/1600	1/6400	1/800	1/400	1/200	1/100	(-)	(-)
IN-3-c2	24	1/800	1/800	1/25600	1/6400	1/1600	1/800	1/200	1/100	1/100

Tabla 9: técnica de ELISA. Resultados obtenidos en los animales del Bloque IN-2 inoculados ~ 22 días post servicio (dps). IN-2-c1 y c-2: hembras no gestantes controles positivo de infección; dPI: días post infección; ND: no determinado (fecha probable de parto)

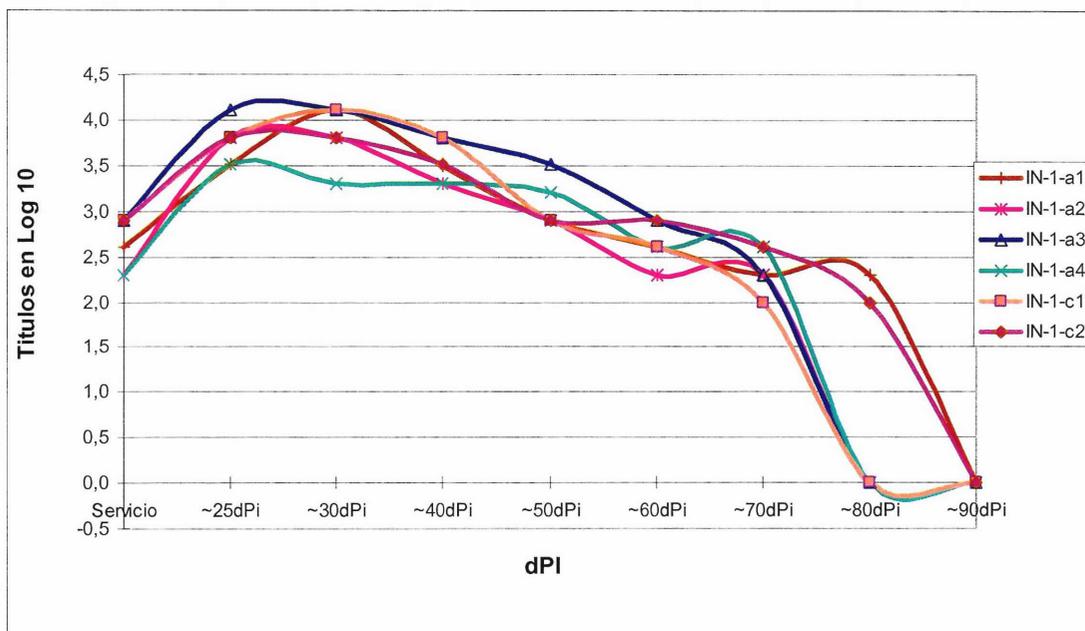


Figura XII: curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN-1 (inoculación previa al servicio). Los datos correspondientes a 30-45 dPI fueron arreglados para la muestras ND tomando un promedio entre los valores anteriores y posteriores para suavizar la curva, de manera de no mostrar un dato falseado. Los títulos fueron transformados en Log. base 10

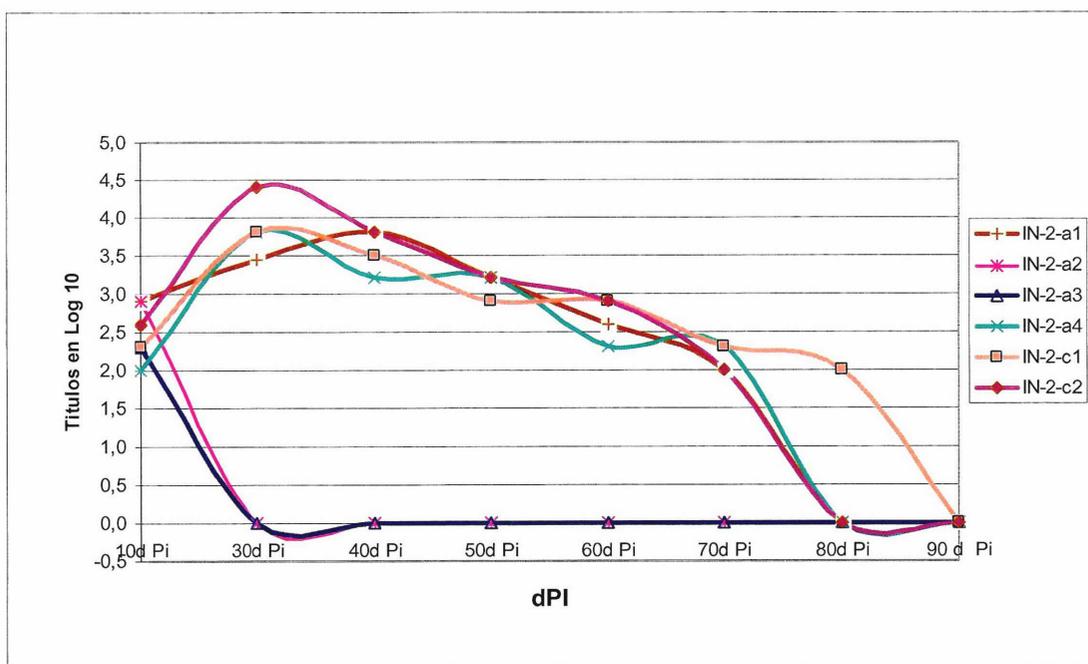


Figura XIII: curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN-2 (inoculación en el 2º tercio de preñez). Los títulos fueron transformados en Log. base 10.

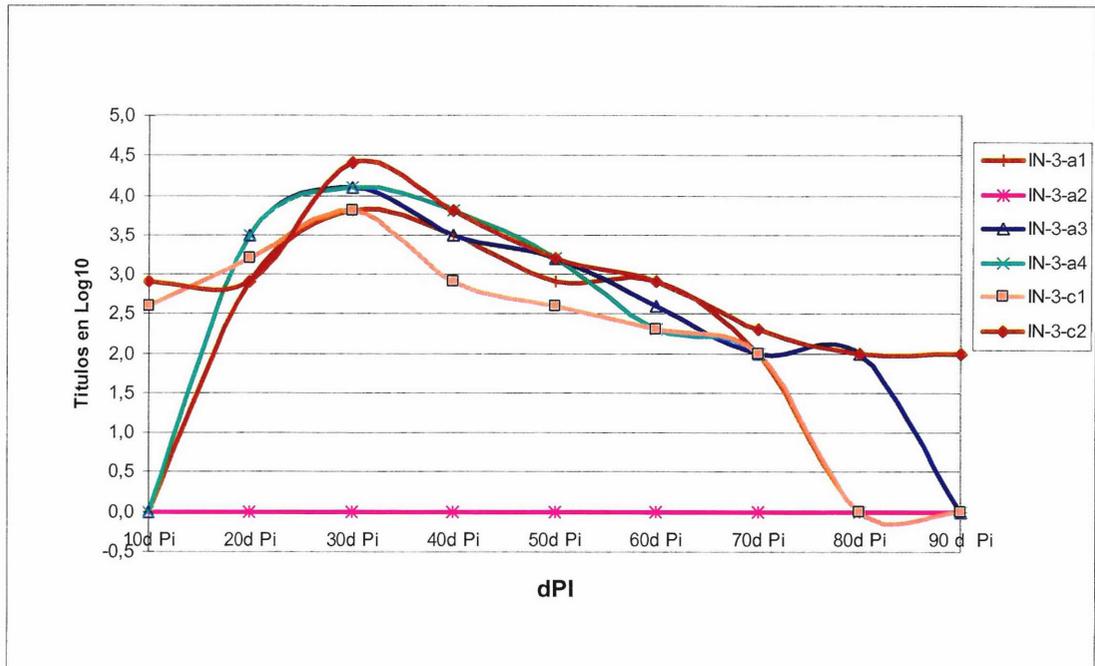


Figura XIV: curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN-3 (inoculación en el 3° tercio de preñez). Los títulos fueron transformados en Log base 10.

4.2.4 Aislamiento viral

Hisopados nasales: los hisopados nasales tomados de los animales inoculados de los tres Bloques de estudio resultaron positivos por AV y fueron titulados para determinar la curva de excreción viral. Los mayores niveles de excreción se observaron al 2do y 3er dPI (Tabla 10, 11 y 12). En la Figura XV, XVI y XVII se observan las curvas de excreción viral obtenidas. Existe diferencia significativa ($p \leq 0,5$) entre los valores obtenidos en diferentes días del mismo animal. No se encontraron diferencias significativas ($p=0,92$) entre los tres Bloques.

El AV fue confirmado por la técnica IHQ realizada en una monocapa celular infectada con cada uno de los virus aislados. (Figura XVIII a y b).

Las muestras de los animales controles negativos de los tres Bloques fueron negativas para AV.

Sangre entera: las muestras tomadas de los tres Bloques de estudio resultaron negativas.

Órganos de fetos, natimortos y/o neonatos: Ninguna de las muestras analizadas de los Bloques IN-2 y IN-3 fue positiva al AV.

Placentas: las muestras tomadas de los animales denominados IN-2-a2 y 3 y IN-3-a2 resultaron negativas al AV.

Bloque IN-1

Animal	Días post infección								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
IN-1-a1	0	10 ^{1,5}	10 ^{3,7}	10 ^{3,1}	10 ^{2,5}	10 ^{1,7}	10 ^{1,1}	0	
IN-1-a2	0	10 ^{1,1}	10 ^{2,9}	10 ^{2,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-1-a3	0	10 ^{2,5}	10 ^{3,1}	10 ^{2,7}	10 ^{1,9}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-1-a4	0	10 ^{1,9}	10 ^{3,1}	10 ^{2,5}	10 ^{1,3}	10 ^{1,3}	0	0	
IN-1-c1	0	0	10 ^{2,1}	10 ^{2,1}	10 ^{1,3}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-1-c2	0	0	10 ^{1,9}	10 ^{2,1}	10 ^{1,3}	10 ^{1,1}	0	0	

Tabla 10: títulos virales obtenidos de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN-1. $p \leq 0.5$ entre dPI por cada animal.

Bloque IN-2

Animal	Días post infección								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
IN-2-a1	0	0	10 ^{2,7}	10 ^{3,3}	10 ^{1,9}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	10 ^{1,1}	
IN-2-a2	0	10 ^{3,5}	10 ^{2,7}	10 ^{2,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-2-a3	0	10 ^{1,9}	10 ^{3,1}	10 ^{2,7}	10 ^{1,9}	10 ^{1,1}	10 ^{1,1}	0	
IN-2-a4	0	10 ^{1,9}	10 ^{2,9}	10 ^{2,5}	10 ^{1,3}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-2-c1	0	0	10 ^{2,7}	10 ^{2,3}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-2-c2	0	0	10 ^{2,1}	10 ^{1,9}	10 ^{1,3}	10 ^{1,1}	0	0	

Tabla 11: títulos virales obtenidos de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN-2. $p \leq 0.5$ entre días dPI por cada animal.

Bloque IN-3

Animal	Días post infección								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
IN-3-a1	0	0	10 ^{3,7}	10 ^{2,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-3-a2	0	10 ^{3,5}	10 ^{3,1}	10 ^{2,7}	10 ^{1,9}	ND	ND	ND	
IN-3-a3	0	10 ^{1,9}	10 ^{2,9}	10 ^{2,5}	10 ^{1,7}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-3-a4	0	10 ^{1,9}	10 ^{3,1}	10 ^{2,5}	10 ^{1,3}	10 ^{1,3}	0	0	
IN-3-c1	0	0	10 ^{2,7}	10 ^{2,3}	10 ^{1,5}	10 ^{1,1}	0	0	
IN-3-c2	0	0	10 ^{1,9}	10 ^{2,1}	10 ^{1,3}	10 ^{1,1}	10 ^{1,1}	0	

Tabla 12: títulos virales obtenidos de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN-3. $p \leq 0.5$ entre dPI por cada animal, ND: no determinada por muerte del animal.

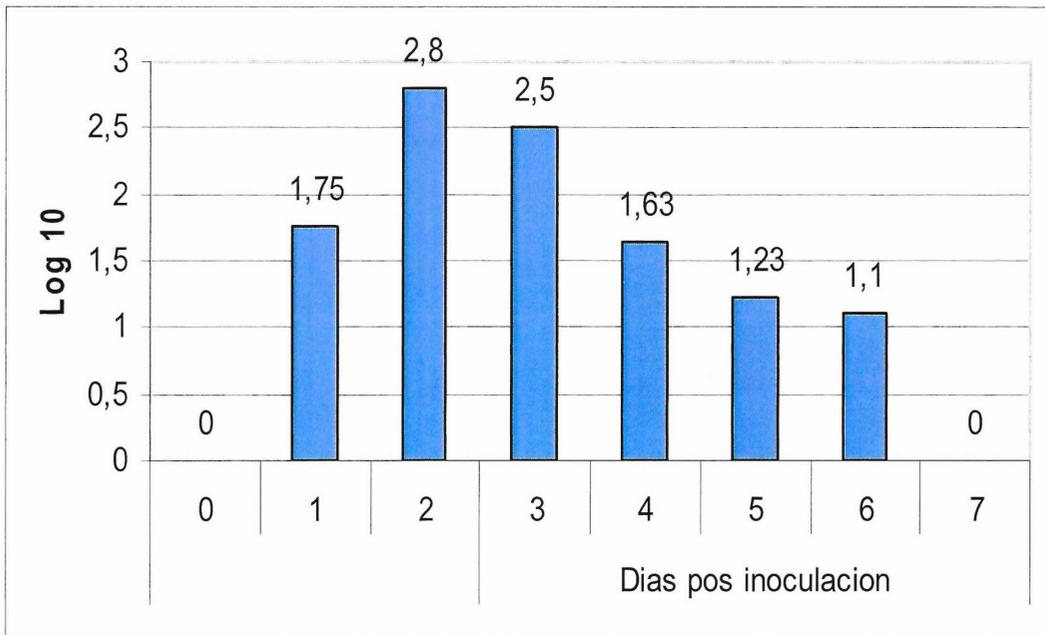


Figura XV: representación gráfica de la excreción viral correspondiente al Bloque IN-1

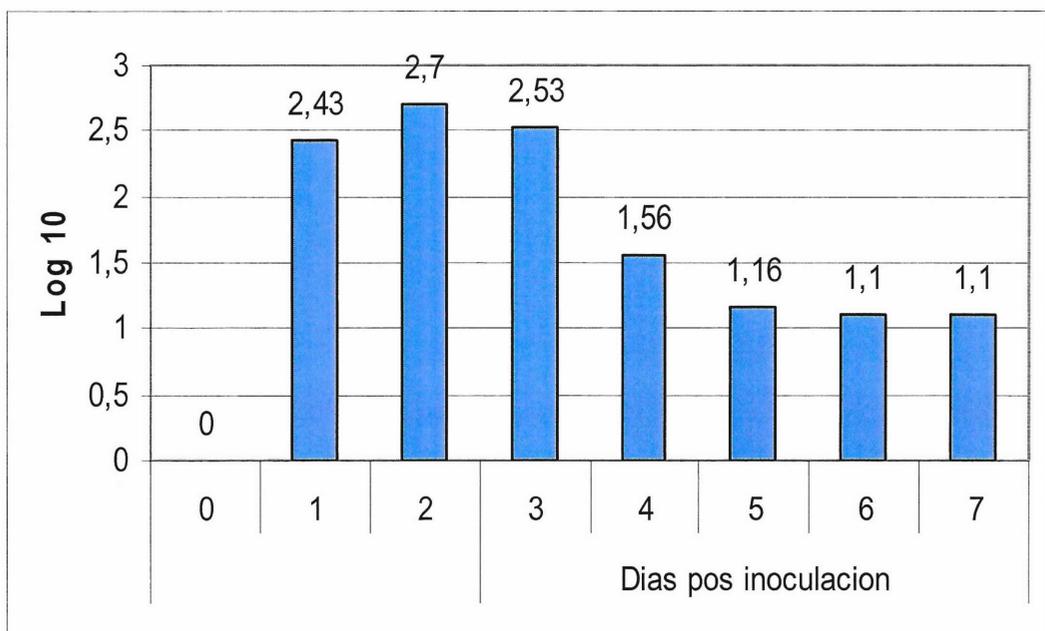


Figura XVI: representación gráfica de la excreción viral correspondiente al Bloque IN-2

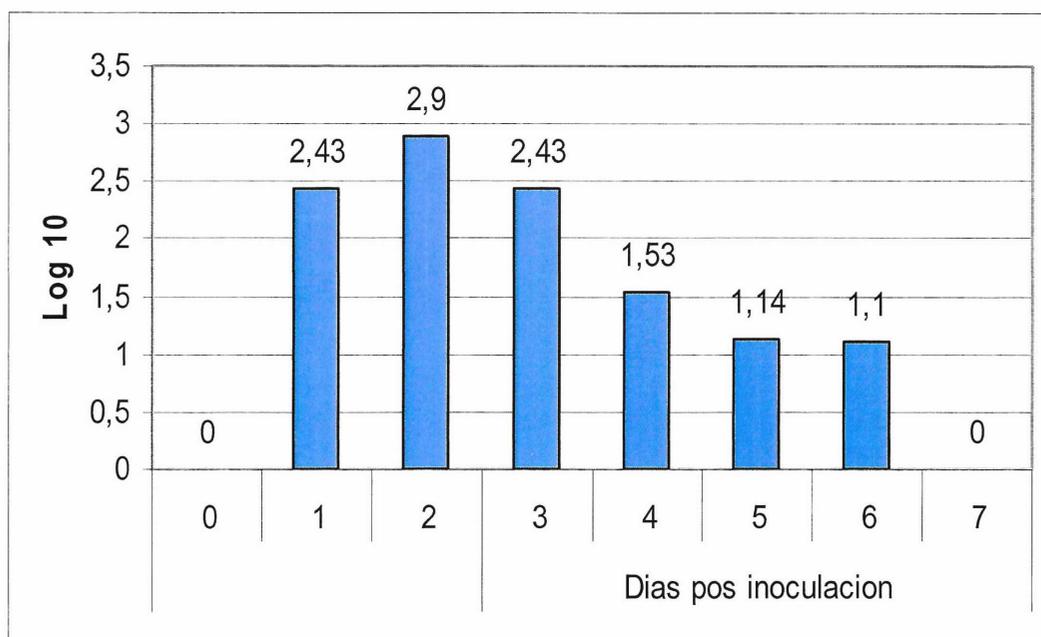


Figura XVII: representación gráfica de la excreción viral correspondiente al Bloque IN-3

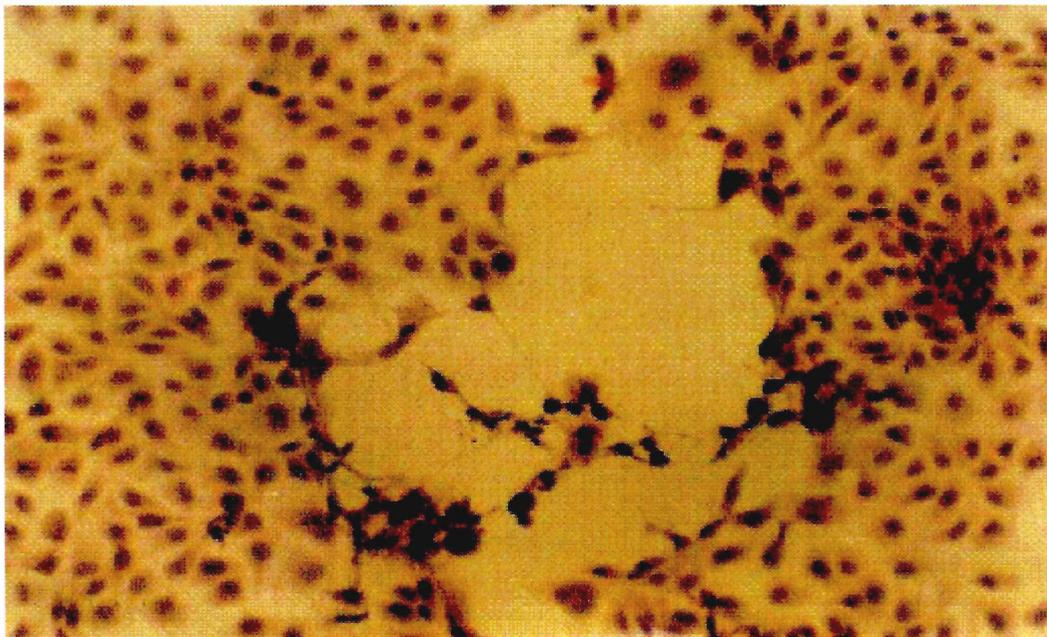


Figura XVIII: técnica de IHQ. Monocapa de células MDBK infectadas con virus recuperado a partir de los hisopados nasales. Se observa ECP. (Obj.20X).

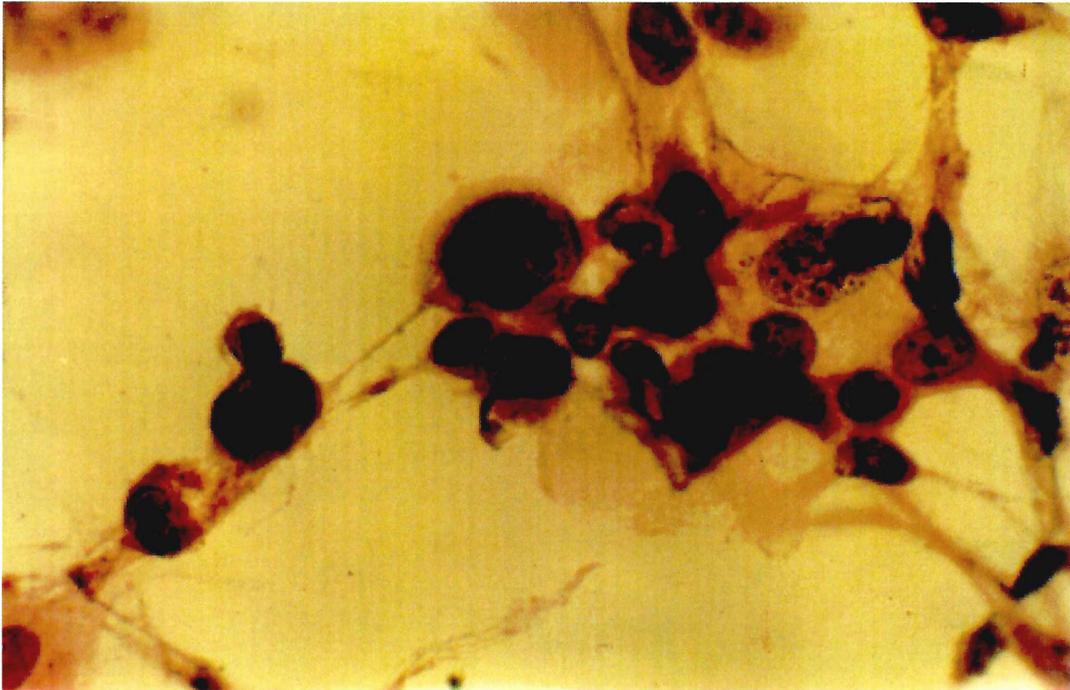


Figura XVIII: técnica de IHQ. Monocapa de células MDBK infectadas con virus recuperado a partir de los hisopados nasales. Se observa el detalle del ECP con Obj. 40 X.

4.2.5 PCR

Sangre entera: las muestras tomadas de los tres Bloques de estudio resultaron negativas.

Órganos de fetos, natimortos y/o neonatos: las muestras de hígado de los animales de IN-2- y IN-3 resultaron negativas.

Placentas: tres de las 8 muestras tomadas del animal IN-2-a2 resultaron positivas. Las 2 muestras de las placentas de la coneja IN-2-a3 y las 4 muestras de la coneja IN-3-a2 resultaron positivas. (Figura XIX)

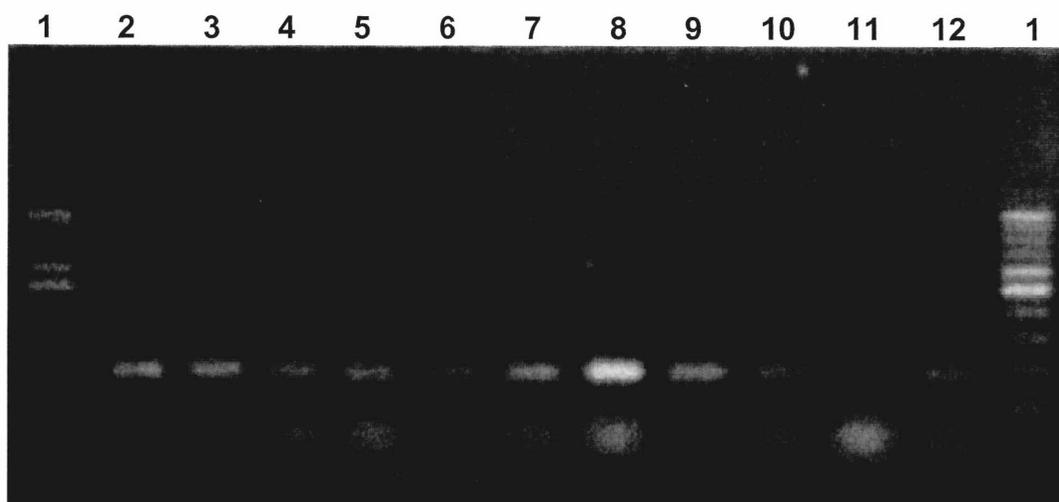


Figura XIX: técnica de PCR para la detección de ADN viral a partir de muestras de placentas. 1: Marcador de PM (Promega 100bp DNA ladder); 2,3 y 4: muestras de IN-2 - a2; 5 y 6: muestras de IN-2-a3; 7, 8, 9 y 10: muestras de IN-3-a2; 11: control negativo (agua destilada); 12: control positivo (ADN viral).

4.2.6 Estudios histopatológicos

Se analizaron las muestras de un gazapo muerto en las primeras 24 h de vida (muerte perinatal) y de dos natimortos de la coneja IN-2-a1. En el primer caso se observaron zonas de atelectasia en pulmones y extensas áreas de hemorragia en hígado. Los riñones no presentaron lesiones. En los natimortos se encontraron cambios producidos por autólisis en pulmón, hígado y riñón. La IHQ resultó negativa para todas las muestras.

Respecto a la coneja IN-2-a2 muerta en el parto, la tráquea no presentaba lesiones; se observaron áreas de congestión, edema, hemorragia y áreas de enfisema y atelectasia en pulmón como así también focos con bacterias y abundante infiltrado de neutrófilos (abscesos). No se observaron CI. Las lesiones

fueron compatibles con bronconeumonía supurativa. (Figura XX, a y b) El hígado mostró grandes áreas de hepatocitos con cambios grasos y células con necrosis coagulativa, con conservación de la integridad de los hepatocitos de la zona periportal. Se observó la presencia predominante de macrófagos y linfocitos y marcada dilatación sinusoidal, edema periportal y células con pigmento biliar. (Figura XXI) Los riñones presentaban zonas con hemorragia glomerular e intertubular, hialinización glomerular, material proteináceo en el espacio de la cápsula de Bowman y presencia de bacteria en los glomérulos. (Figura XXII) En útero no se observaron lesiones. La IHQ resultó negativa en pulmón, hígado, riñón y útero. Los tres natimortos presentaron severos cambios autolíticos que no permitieron evaluar la presencia de lesiones.

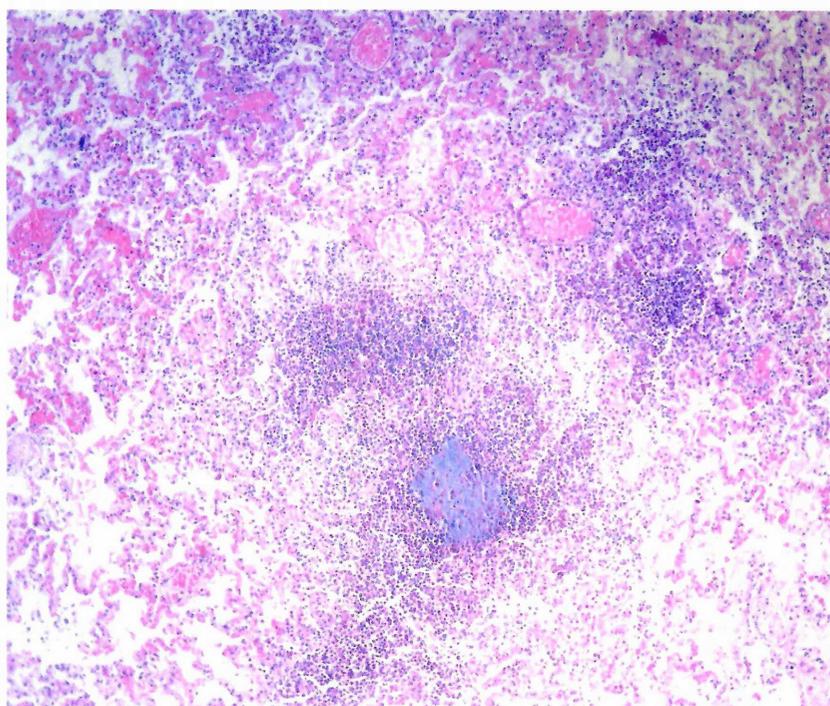


Figura XXa: pulmón, con neumonía supurativa. Se destacan focos de infiltración de neutrófilos y colonias bacterianas centrales. H-E (Obj. 10X)

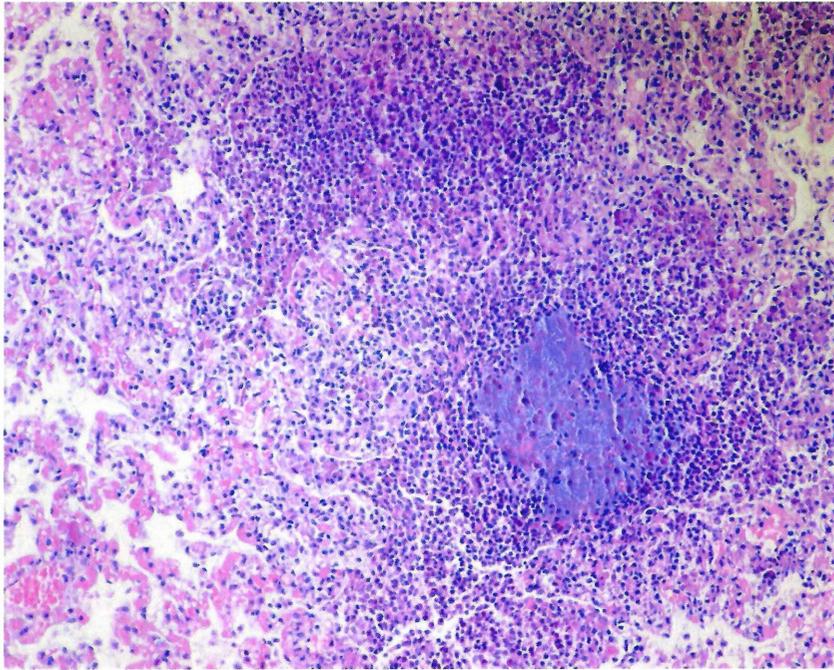


Figura XX b: pulmón, con neumonía supurativa. Detalle de la imagen anterior. H-E (Obj.20X)

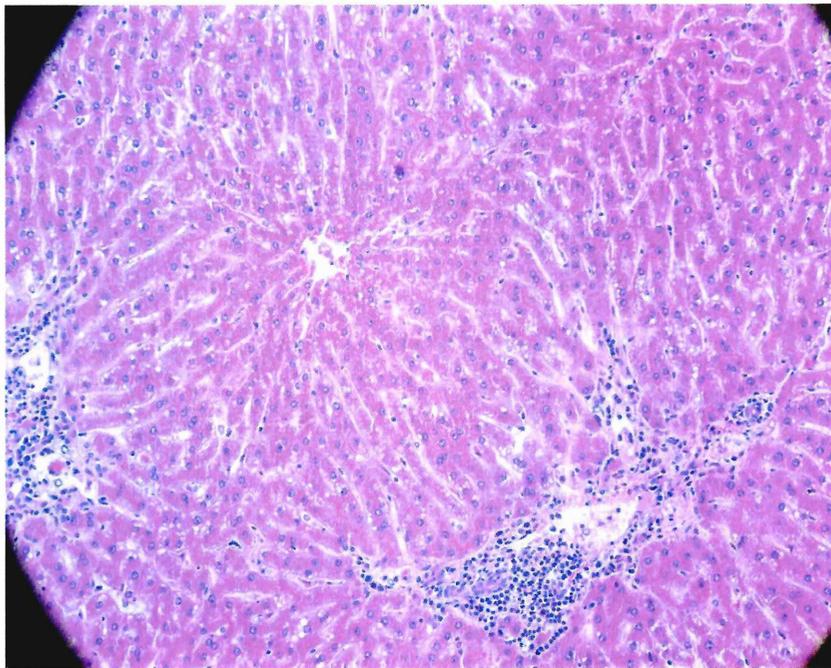


Figura XXI: hígado con abundante infiltrado mononuclear en los espacios porta. H-E (Obj.20X)

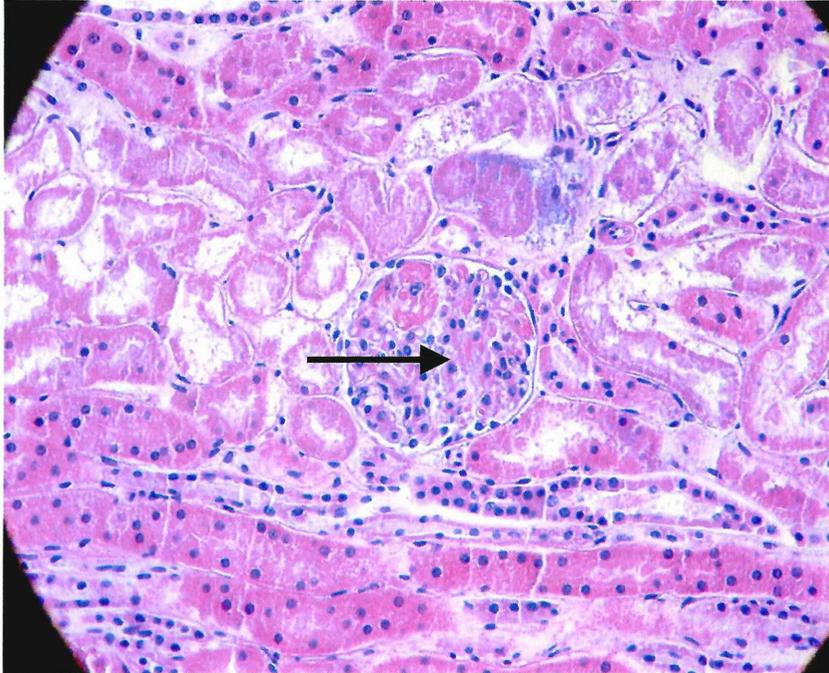


Figura XXII: riñón con trombosis glomerular, cambios degenerativos y bacterias en la luz de los túbulos H-E (Obj. 40X).

El animal IN-2-a3 (muerto 4 días antes del parto) no presentó lesiones en tráquea. En pulmón se observaron zonas colapsadas, otras con marcada respuesta intersticial y focos diseminados con abundante cantidad de macrófagos y neutrófilos. (Figura XXIII)

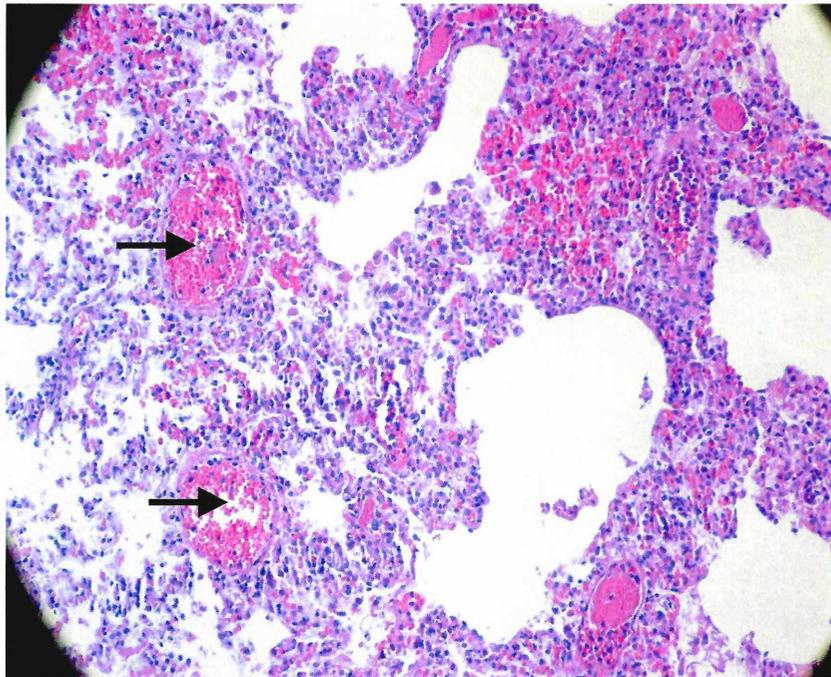
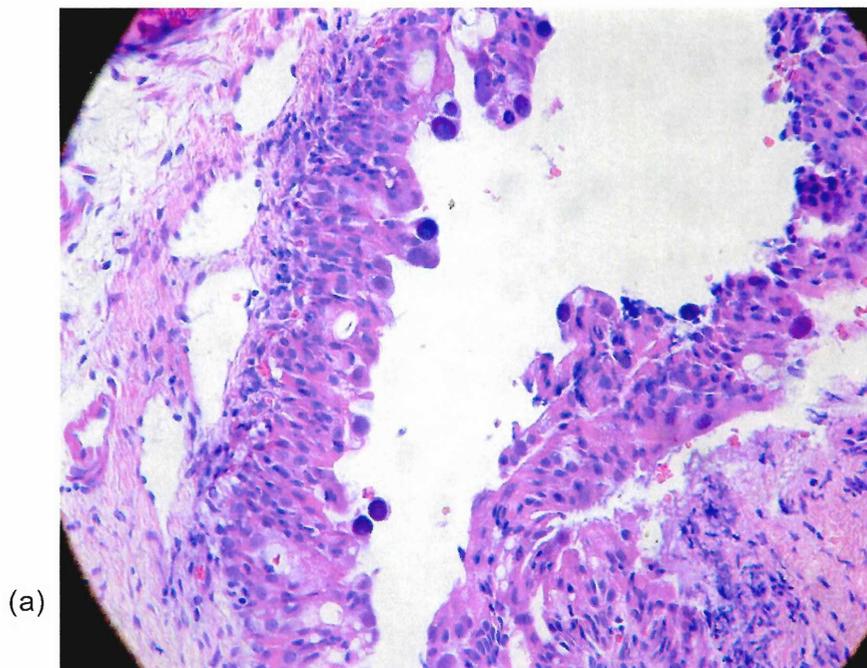


Figura XXIII: pulmón. Se observa trombosis vascular, hiperemia y hemorragia, y células inflamatorias en el intersticio alveolar. H-E (Obj. 20X)).

El hígado presentó retracción y necrosis de células individuales y escasas células inflamatorias (mononucleares y ocasionales eosinófilos) en espacio porta. Se observaron células acidófilas y otras necróticas. Los riñones y el útero no presentaron particularidades. Los dos fetos de este animal como así también los dos neonatos hipoquinéticos de la coneja IN-2-a4 y el natimorto de la coneja IN-3-a1 solo presentaban cambios grasos en hígado no observándose ninguna particularidad en el resto de los órganos.

En las muestras de pulmón tomadas del animal IN-3-a2 muerto a los 4 dPI (6 o 7 días antes del parto) se observaron áreas de enfisema y focos neumónicos

con macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Las muestras de cornete nasal presentaron CI típicos (Figura XXIV) y la IHQ resulto positiva, confirmando la presencia de Ag virales específicos (Figura XXV). El hígado presentó regular cantidad de células inflamatorias en el espacio porta. Los riñones se presentaron con áreas focales de hiperemia, focos de hemorragia glomerular e intersticial cortical y cortico-medular y acúmulos inflamatorios mononucleares (nefritis intersticial no supurativa). En útero se observaron algunas glándulas endometriales dilatadas y quísticas con moderada infiltración de células mononucleares en lámina propia del endometrio superficial y marcada hiperemia. (Figura XXVI).



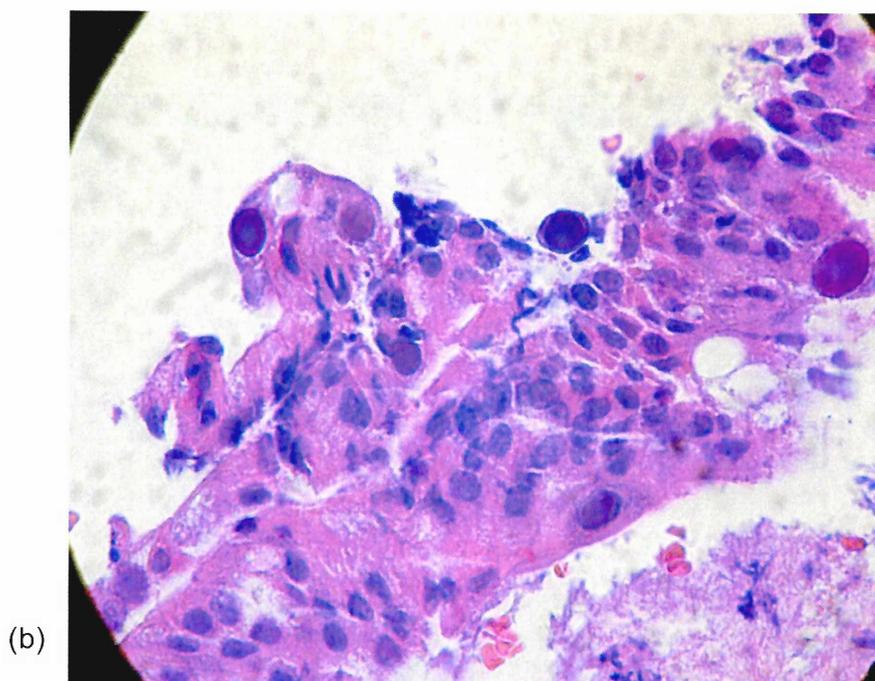


Figura XXIV: a H-E (Obj.40X) cornete nasal. Se observan cuerpos de inclusión viral intranucleares, redondos e intensamente basofílicos. En la imagen b (Obj. 100X) se observa marginación de la cromatina nuclear como resultado del cuerpo de inclusión.

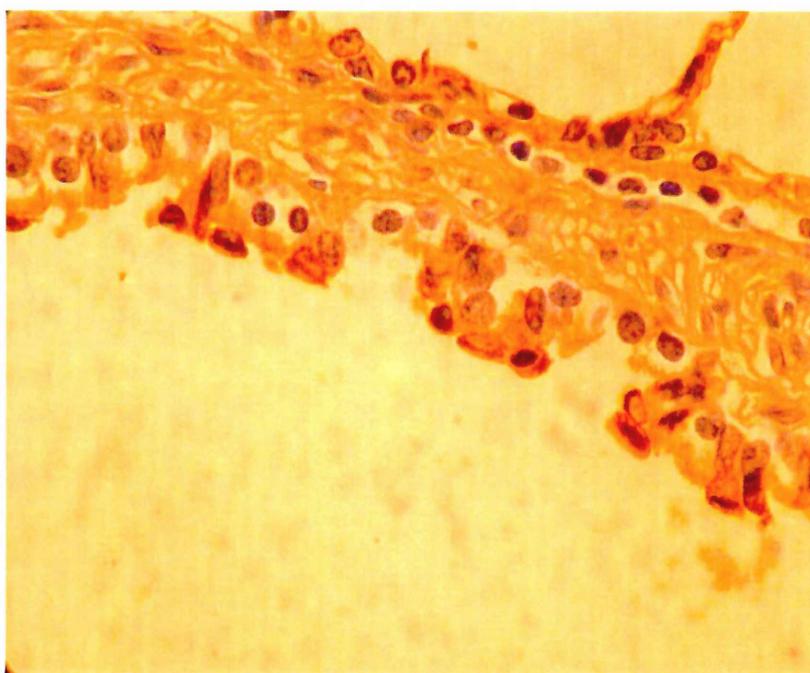


Figura XXV: IHQ de cortes de pulmón. Se observa inmunomarcación positiva en las células de la mucosa del bronquiolo, indicando la presencia de antígeno viral. Técnica de inmunoperoxidasa (Obj. 40X).

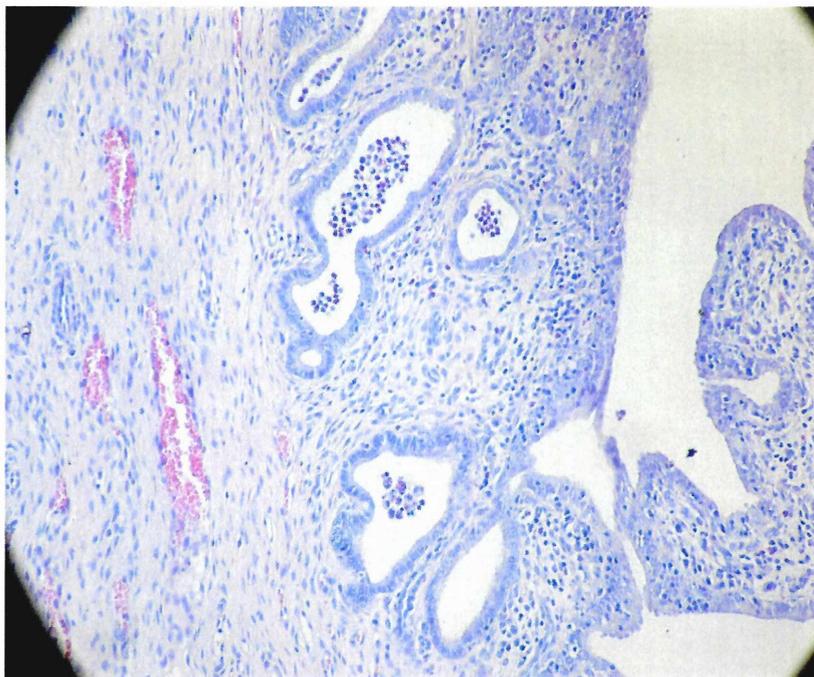


Figura XXVI: H-E (Obj. 20X) corte de útero con hiperplasia endometrial, incremento de la extensión y profundidad glandular.

Los cuatro nonatos muertos estudiados del animal IN-3-a2 así como el neonato hipoquinético IN-3-a4 solo presentaron cambios grasos en hígado.

En todas las placentas analizadas (IN-2-a2 y a3 y IN-3 a2) se observaron focos de mineralización de arterias y focos de necrosis. También se presentaron zonas de autólisis y zonas hiperémicas. La técnica de IHQ resultó negativa en todos los casos. (Figura XXVII)

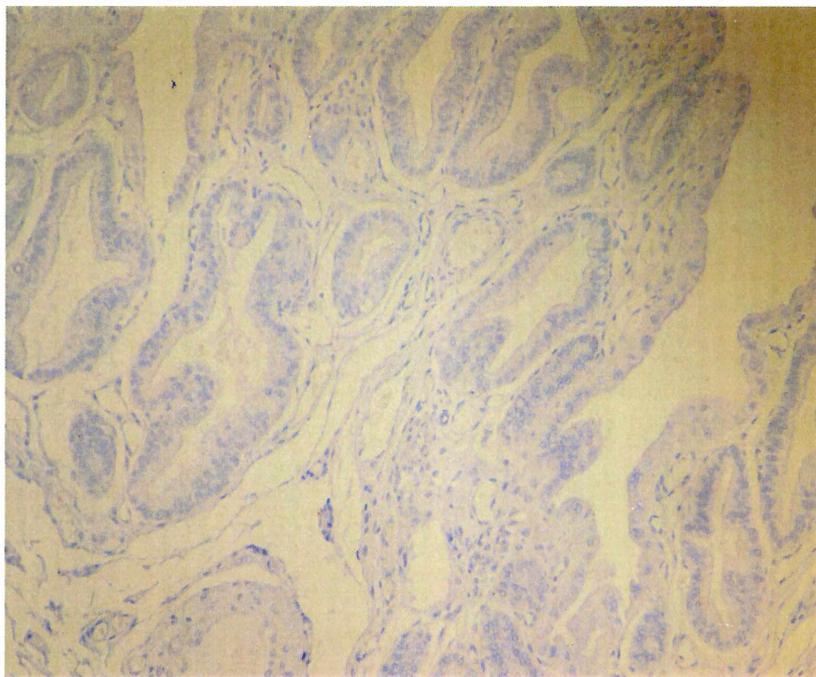


Figura XXVII: (Obj. 20X). IHQ negativa de la placenta del animal IN-2-a2.

5. DISCUSSION-CONCLUSIONES

Desde hace mucho tiempo por razones prácticas, éticas y humanas se han desarrollado modelos de animales para su aplicación en investigaciones biomédicas. Los modelos animales se definen como *“organismos vivientes con una inherente adquisición natural a procesos patológicos inducidos o espontáneos que de una u otra manera semejan el mismo fenómeno ocurrido en el huésped natural”*. (166)

Los animales de laboratorio son modelos muy convenientes y herramientas útiles para utilizar en el estudio de muchas enfermedades de origen viral. En el caso de medicina veterinaria y sobre todo cuando se trata de grandes animales el uso del huésped natural para estudiar aspectos patogénicos e inmunológicos de una infección, muchas veces se torna dificultoso por el manejo laborioso de estos animales como también por el costo que ello implicaría.

Debido a estas circunstancias, se planteó como principal objetivo de este trabajo demostrar que el conejo es un modelo válido para estudiar la infección por BHV-1.1, tanto en su manifestación respiratoria como abortigénica, hecho no bien documentado a la fecha.

Se describe la infección experimental con BHV-1.1 en el conejo y la reproducción de la infección respiratoria y abortigénica que continúa a la vía natural de infección y que desencadena manifestaciones clínicas y respuesta inmune humoral evaluables.

En la primera etapa de esta tesis se procedió a realizar la experiencia con él método de Brown (introducción del inóculo por trepanación del seno paranasal) trabajando con los dos primeros Bloques de animales. No se evidenciaron signos

clínicos ni se detectó la presencia de virus en las muestras tomadas. Los animales llegaron al parto normalmente y solo se detectaron Ac. Al comprobarse la ausencia de resultados en los Bloques 1 y 2 no se trabajó con los animales del Bloque 3 y debido a que este método por trepanación no resultó eficaz para nuestra experiencia se procedió a modificar el método de infección. Es por eso que se utilizó un método de inoculación directa que respeta la puerta de entrada natural del virus con el objetivo de reproducir el mecanismo de infección natural. Con la utilización de anestesia local que desensibilizó a la mucosa e impidió la expulsión refleja del inóculo y con la ubicación vertical del animal se logró introducir la suspensión viral. El método resultó exitoso ya que a las 24 h PI se confirmó la infección con la aparición de los síntomas respiratorios a diferencia del bovino en donde el periodo de incubación puede llegar hasta 1 semana. (87, 146, 147)

La manifestación clínica respiratoria fue similar a la producida en el bovino y se produjo en todos las conejas inoculadas en los diferentes periodos de gestación.

Los registros de temperatura realizados no sufrieron variaciones. Este hecho puede deberse a que según datos aportados por otros autores (100) la respuesta febril es de menos de 24 h de duración a partir de iniciados los síntomas y no se produce en todos los casos. Por otro lado y según cita la “Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio” (National Research Council,

Nacional Academy Press, Washington DC, USA 1996) para ser posible la evaluación de pequeñas variaciones en la temperatura de los animales, deberían estar en ambientes con temperatura y atmósfera controlada, condiciones que en esta experiencia no fueron utilizadas.

La reproducción clínica de la infección, el AV a partir de las muestras de hisopados nasales y las curvas ascendentes de excreción viral registradas demostraron una activa multiplicación y eliminación del virus. La presencia de CI en cornetes nasales y la reacción de IHQ positiva en los animales muertos reconfirmaron y revalidaron el método utilizado y el establecimiento de la infección.

En ninguno de los casos se observaron signos nerviosos, hallazgos que obtuvieron otros autores a pesar de haber inoculado BHV-1.1 (57, 142, 146) Esto se debe precisamente a que en el caso de experiencias de reproducción de enfermedad neurológica en conejos, la edad de los mismos es un factor determinante y los animales no sobrepasaban los 30-45 días de edad. En esta experiencia todos los animales empleados fueron adultos.

Como resultado de la infección y la complicación bacteriana secundaria se sucedieron una serie de eventos de similares características que las que cita Tikoo (61) para el bovino, de manera que a partir de la sintomatología clínica observada a nivel de tracto respiratorio superior, en el modelo experimental, se desencadenó una severa neumonía que condujo a la muerte del animal. La reacción de IHQ confirma la detección de Ag virales y los hallazgos

histopatológicos demuestran lesiones típicas compatibles con infecciones bacterianas concomitantes.

En relación a la detección de virus en sangre (viremia) las experiencias de Fuchs y col (114) en bovinos demuestran que el virus es transportado por los leucocitos y puede ser aislado. Otros autores (64, 103), hacen referencia a que es muy poca la cantidad de partículas virales que se unen o se transportan en los leucocitos y no siempre el AV a partir de los mismos es posible. En esta experiencia no fue positivo el AV ni la detección de ADN viral por PCR a partir de las muestras de sangre extraídas. Esto concuerda con las afirmaciones de Tikoo que hacen referencia al corto periodo de viremia para el bovino y a que la recuperación de virus a partir de leucocitos no siempre es exitosa. (61)

Probablemente en este modelo experimental y para determinar el momento exacto de recuperación viral y la duración de la viremia como así también estudiar las variaciones de los diferentes tipos celulares involucrados en la IMC, deberían tomarse las muestras en lapsos mas cortos en las primeras 24 h. lo que en nuestro caso constituía un riesgo ya que podría haber llevado a los animales a un aborto espontáneo o muerte por estrés traumático con modificaciones de los resultados. Consideramos que se debería trabajar primero con el modelo respiratorio en animales no gestantes y establecer de esa manera los tiempos de toma de las muestras seriadas de sangre para evaluar los parámetros anteriormente mencionados.

El aborto por BHV-1 en este modelo experimental sólo se menciona en la bibliografía como un hallazgo casual resultado de la infección por BHV-1.1 en

conejas preñadas pero en ningún caso se evalúa como tal para validar el modelo conejo en el estudio de la infección abortigénica. Así Lupton en 1980 cita al aborto por BHV-1 como un hecho producido en algunas conejas inoculadas por vía intravenosa, sin embargo no se detallan registros de signos clínicos previos al mismo. (100)

Si analizamos el primer Bloque de animales (inoculados 10-15 días anteriores al servicio), la manifestación clínica respiratoria fue evidente y la respuesta serológica determinada por ELISA permite confirmar la infección. Este Bloque de estudio fue utilizado en reemplazo del Bloque que debería haber sido infectado en los primeros 10 días del servicio. Este reemplazo se realizó principalmente para evitar molestar a los animales recién servidos que ante el estrés por el manejo pudieran abortar espontáneamente produciendo resultados confusos.

Observamos que en todos los animales de este Bloque no hubo palpación gestacional positiva ni parto posterior. Podría suponerse que la acción del virus impidió la concepción y el establecimiento de la preñez. Este hecho se ha observado en el bovino al registrarse bajos índices de preñez consecuente con endometritis causada por el virus presente en semen utilizado en inseminación artificial. Esta sería una posible explicación a la falla de preñez en nuestro modelo.

De acuerdo a algunos autores, la placenta hemocorial del conejo desde la concepción y hasta los 3-5 días posteriores presenta estructuras especializadas (“pliegues”) que cumplirían función en la nutrición del futuro embrión. Se puede

inferir entonces que en un nuevo diseño sería factible la detección de estas estructuras con estudios histológicos progresivos a partir del día del servicio lo que permitiría esclarecer entonces si hubo concepción y anidación. (167).

En el segundo Bloque de animales, aquellos inoculados aproximadamente a los 15 dps es decir en el segundo tercio de la preñez, las manifestaciones clínicas fueron coincidentes con aquellas del primer Bloque. Dos de los animales murieron con evidente signos de neumonía producida por complicaciones bacterianas secundarias. Las muestras de fetos y neonatos tomadas de todos los animales, aquellos que murieron y los que llegaron al parto normalmente, fueron negativas a AV y PCR y tampoco se observaron lesiones típicas ni CI. Estos datos coinciden con lo expresado por algunos autores para la infección natural en el bovino en donde demuestran moderadas lesiones en feto aunque no detectan CI ni alteraciones microscópicas que confirmen la infección por BHV-1.1 (168) Igual que sucede en el bovino la muerte fetal habría sucedido entre las 24-48 h de la infección y la demora en la expulsión de los fetos hace que una vez recuperados los mismos estén presentes severos signos de autólisis dificultando el estudio histológico, el AV y probablemente la detección de ADN viral por PCR. Está bien documentada la relación de los efectos tóxicos y/o inhibitorios que las muestras clínicas pueden ejercer sobre la PCR como así también la pérdida de infectividad de la partícula viral, condición indispensable para ser aislada en cultivos celulares. Estos datos coinciden con los expuestos por Naeem y col. en estudios experimentales con BHV-4 en conejo (148). Para evaluar las lesiones en feto y recuperar virus a partir de los mismos, se debería modificar el diseño. Un

nuevo diseño permitiría tomar muestras seriadas y establecer los cambios producidos antes de que ocurran los fenómenos de autólisis.

En las conejas del Bloque 3, los síntomas manifiestos coincidieron con los de los Bloques anteriores y uno de los animales murió también con signos evidentes de neumonía. Los fetos y natimortos analizados no presentaron cambios histológicos patognomónicos.

El aspecto más importante a ser considerado al evaluar al conejo como modelo experimental es la diferente estructura de la placenta en relación con la del bovino. Es por ello que resulta importante destacar el porqué se plantea la hipótesis que este modelo experimental sería útil para estudiar la infección abortigénica por BHV-1.1. En el útero bovino preñado se establece un estrecho contacto entre la placenta epiteliocorial (Sindesmocorial) y el feto a través de estructuras denominadas placentomas de manera que esta interdigitación entre la madre y el feto aumenta la superficie de contacto. La bibliografía cita que la ruta del BHV-1 hacia el feto involucra la ruta sanguínea a través del cordón umbilical ya que en el feto las lesiones primarias se suceden en el hígado. (111) En el conejo en cambio la placenta es de tipo hematocorial sin embargo también se sucede el mismo fenómeno produciéndose un estrecho contacto entre la madre y el feto lo que para algunos autores, luego de la mitad de la gestación estaría dado porque solo el endotelio fetal separaría a ambos (hemoendotelial). (169)

Es por eso que consideramos que los resultados más relevantes de este estudio, lejos de ser los definitivos y de requerir otro tipo de diseño experimental, lo constituyen los datos aportados por los estudios de las placentas de los

Bloques 2 y 3. Se observaron focos necróticos alternados con zonas de hiperemia y otras de autólisis. Esto es coincidente con los datos aportados por Gibbs para el bovino quien cita que los cotiledones pueden presentar lesiones degenerativas aunque no son patognomónicas. (25) Las lesiones histológicas observadas en la placenta bovina revelan además marcado edema perivascular y extensiva necrosis coagulativa en el corioalantoides lo que conduce a una severa y gradual cese de la circulación placental llevando al desprendimiento de la misma y al aborto subsecuente, sin observación de lesiones típicas virales en el feto. Por otro lado hallazgos detallados por Smith (1997) revelan evidencias de AV en placenta a pesar de ausencia de lesiones. (111)

En el caso de otros herpesvirus como el que produce el aborto equino también se observan abortos sin poder aislarse el virus de las placentas las que a veces no presentan lesiones, como así también se detectan placentas infectadas y fetos libres de virus. (111)

En nuestro caso el AV no fue positivo, sin embargo el dato mas significativo de este estudio es la detección de ADN viral a partir de las muestras de placentas lo que confirma el pasaje del virus a través de la misma.

En relación a la respuesta inmune humoral, trabajos realizados por Honda y col. (151) determinaron la respuesta de Ac en conejos inoculados por vía intratraqueal e intravenosa. Los resultados hallados por los autores indican un pico de detección de Ac por neutralización y por ELISA entre las 3-4 semanas

posteriores a la primera inoculación a pesar de no haberse registrados signos clínicos y los Ac decrecen a partir de las 9 semanas PI. Estos datos son coincidentes con la infección en el huésped natural. En esta experiencia y en concordancia con los autores, en todos los Bloques de estudio el mayor pico de Ac se detectó a los 30-35 dPI, decreciendo posteriormente para llegar a valores indetectables entre los 80 y 90 dPI que fue el punto final de la experiencia. Por otro lado puede observarse la detección de Ac, aunque en muy bajos niveles, en los gazapos que mamaron calostro. (151) No fue posible determinar la razón de la toxicidad de los sueros para la línea celular utilizada en la técnica de VN.

En este trabajo no se evaluó la IMC debido a que para poder obtener resultados relevantes deberían haberse intensificados la toma de las muestras de sangre en las primeras 24-48 h y modificar el diseño experimental planteado originalmente. Estos datos consideramos que son de suma importancia obtenerlos en un futuro trabajo por que permitirán esclarecer aspectos de la implicancia de la IMC en las infecciones por herpesvirus y que aun permanecen sin dilucidar.

La utilización de este modelo experimental permitirá además la posibilidad de continuar con los estudios de latencia y reactivación de virus latente y sobre todo evaluar la patogenicidad de diferentes cepas de BHV-1.1 y la respuesta inmune a distintos inmunógenos.

CONCLUSIONES

- Se reprodujo la infección experimental recuperándose virus del tracto respiratorio superior de los animales con signos clínicos respiratorios, confirmándose la misma por las lesiones histopatológicas halladas y la inmunomarcación positiva
- No se confirmó preñez en los animales que se inocularon previo al servicio.
- El modelo permitió obtener datos valiosos cuando se inocularon los animales en el 2º y 3º tercio de gestación.
- El establecimiento de la infección produjo una respuesta serológica evaluable similar a aquella analizada en el huésped natural.
- Los resultados de esta experiencia indican la habilidad del BHV-1.1 de establecer la infección en conejas gestantes

6. BIBLIOGRAFIA

- 1- Roizman B and Batterson W. Herpesvirus and their replication. In: Virology. B.N.Fields editor et al. Raven press, New York. 1985. p. 497-526.
- 2- Roizman B, Carmichael F, Deinhardt G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F et al. Herpesviridae: Definición, nomenclatura provisional y taxonomía. Intervirolog. 1981; 16: 201-207.
- 3- Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 1992; 123: 425-449.
- 4- Roizman B, Knippe D. Herpes simplex viruses and their replication. En: Knippe D, Howley P, Editors. Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos. 2001.
- 5- Coto CE y de Torres RA, editores. Naturaleza y estructura de los virus animales. 1° ed. Bs As, Argentina: Edigem S.A ; 1983. p.101-103.
- 6- ICTVdb. Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ictvdb/ictv.->
- 7- Berria MI. Familia herpetoviridae. In: Carballal G y Oubiña JR, editores. Virología Médica. Bs As: Editorial El Ateneo; 1998. p. 327- 338.
- 8- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Editores. Herpesvirus. In: Microbiología Médica, México DF: El Manual Moderno SA; 1992. p. 451-473.
- 9- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Structure, genome organization, and infectious cycles. En: Principles of virology. 2° ed. Washington DC. USA: ASM Press 2004. p. 811-812
- 10- Delhon G, Morales M, Lu Z, Alfonso C, Flores E, Weiblen R. Genome of bovine herpesvirus 5. J. Virol. 2003; 77: 10339-10347.

- 11- Murphy F. The family Herpesviridae: an update. Arch Virol. 1992; 123: 425-449.
- 12- Roizman B. Multiplication of Viruses: An Overview, In: Virology, B.N.Fields editor et al. Raven press, New York. 1985. p. 69-76.
- 13- Liang X, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Fitzpatrick DR, Zamb TJ . Bovine Herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gII, and gIV. J. Virol. 1991; 65 (3): 1124-1132.
- 14- Kaashoek Marianne. Marker vaccines against bovine herpesvirus 1 infections. [Tesis de doctorado]. Utrecht Universiteit. 1995.
- 15- Pidone C. Estudio comparativo de cepas de Virus Herpes bovino –1 aisladas en la Argentina, mediante patrones de restricción del ADN. [Tesis de Maestría en el área de Salud Animal con especialización en enfermedades transmisibles] Universidad de Buenos Aires; 1995.
- 16- Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray ME. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. Analecta Veterinaria. 1999 ; 19: 40-50.
- 17- Pidone CL. Taxonomía Viral Veterinaria. Vet. Arg. 1999 XVI; 160: 759-764.
- 18- Bratanich AC, Sardi SI, Smitsaart EN and Schudel AA. Comparative Studies of BHV-1 Variants by *in vivo* - *in vitro* tests. J. Vet. Med. B. 1991; 38: 41-48.
- 19- Collins JK, Ayers VK, Whetstone CA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. J. Gen. Virol. 1993; 74: 1509-1517.

- 20- Brown F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canadá, 1987; *Intervirol.* 1989; 30 (4): 181-186.
- 21- Friedli K and Metzler AE. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch. Virol.* 1987; 94: 109-122.
- 22- Metzler AE, Schudel AA and Engels M. Bovine Herpesvirus 1: Molecular and Antigenic Characteristics of Variants Viruses Isolated from Calves with Neurological Disease. *Arch. Virol.* 1986; 87: 205-217.
- 23- Suarez Heinlein A, Metzler AE, Weiblen R, Berrios P, Schudel AA, Rodriguez M. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-Page. *J. Vet. Med. B.* 1993; 40: 125-130.
- 24- Benítez MD. Rinotraqueítis infecciosa bovina. *INTA informa* 1990; Ed. 2181.
- 25- Gibbs EPJ, Rweyemamu MM. Bovine herpesviruses. *Vet. Bulletin.* 1977; 47 (Pt I): 317-332.
- 26- Seal BS, St. Jeor SC and Lee Taylor RE. Restriction Endonuclease Analysis of Bovine Herpesvirus 1 DNA and Nucleic Acid Homology between Isolates. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 2787-2792.
- 27- Studdert MJ. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 1989; 125 (23): 584.
- 28- Mc Kercher DG. Viruses of other vertebrates. En: AS Kaplan , editor. *The Herpesviruses.* New york, Estados Unidos: Academic Press Inc.: 1973. p. 429-441.

- 29- Jensen R, Griner LA, Chow TL, and Brown W W. Infectious rhinotracheitis in feedlot cattle. I Pathology and symptoms. 59th Annual meeting U.S. Livestock Sanit. Assoc. 1955. p.189-199.
- 30- Miller JM. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass.1955; 126: 463.
- 31- Mohanty SB, Dutta SK, editores. *Virología Veterinaria*. 3^o Ed. Interamericana. Mexico, DF, 1988. p. 113-118.
- 32- Schroder RJ and Moys MD. An acute respiratory infection of dairy Cattle. J. Am. Vet. Med. Ass. 1954; 125: 471.
- 33- Madin SH, York CJ. And Mc Kercher DC. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. Science. 1956; 124: 721-722.
- 34- Yates WDG. A review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle. Can. J. Comp. Med. 1982; 46: 225-263.
- 35- Pastoret PP, Burtonboy G, Aguilar-setien A, Shoenaers F . Mesure de l'ecreton du virus de la rinotracheite infectieuse bovine après inoculation experimentale. Ann. Med. Vet. 1978; 122: 441.
- 36- Studdert MJ. Bovine herpesvirus. En: Webster RG and Granoff A, editors. *Enciclopedia of Virology*. Great Britain; Academic Press; 1994. p. 155-158.
- 37- Epstein B, Gil Turnes G, Etcheverrigaray ME. Aislamiento del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y *Listeria monocytogenes* de un feto bovino. Rev. Med. Vet. 1972; 53: 99-102.

- 38- Carrillo BJ. Encefalitis en bovinos por herpesvirus. Rev. Med. Vet. 1982; 63 (5): 372-376.
- 39- Carrillo BJ, Ambrogi A, Schudel AA, Vázquez M, Dahme E, Pospischil A. Meningoencephalitis caused by IBR Virus in Calves in Argentina. Zentralbl Vet. B. 1983; 30: 327-332.
- 40- Carrillo BJ, Pospischil A, Dahme E. Pathology of Bovine Viral Necrotizing Encephalitis in Argentina. Zentralbl Vet. B. 1983; 30: 161-168.
- 41- Fondevila NA, Lager IA, Sadir AM, Carrillo BJ, Villar J, Venzano A, et al. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (HVB-1) III: Prevalencia de anticuerpos en rodeos bovinos del país. Revista de investigaciones agropecuarias INTA. Bs. As, Argentina 1981; 16 (2): 285-289.
- 42- Schudel AA, Rodríguez M y Carrillo BJ. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. CICV - INTA - Castelar. INTA ediciones. 1987.
- 43- Alegre M, Nanni M y Fondevila N. Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and 5. J. Vet. Med. B. 2001; 48: 613-621.
- 44- Maliandi FS, Fernández F, Barrandeguy M, Gammelgard M, Corva S. Encuesta epidemiológica sobre infecciones virales en bovinos lecheros. V Congreso Argentino de Virología. 1996; Tandil, Bs. As., Argentina. p. 75
- 45- Bowes N, Isnovich L, Morgavi M. Reproducción experimental de rinotraqueítis bovina. Gaceta Veterinaria. 1970; 32: 181-186.

- 46- Lager A, Fondevila N, Sadir A.M, Fernández F, Schudel A.A. Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) 1: aislamiento y caracterización biológica del agente etiológico (L-114). *Rev. Med. Vet.* 1981; 62: 404-410.
- 47- Bagust TJ and Clark L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.* 1972; 82: 375-382.
- 48- Narita M, Inui S, Namba K, and Shimizu Y. Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Path.* 1976; 86: 93-100.
- 49- Blanco Viera FJ, Duffy SJ, Miquet JM, Pereira JJ, Corbellini CN, Vena MM, et al. Meningoencefalitis en bovinos con aislamiento del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en la Provincia de Buenos Aires. *Gaceta Veterinaria XLV.* 1983; 381: 597-600.
- 50- Combessies GM, Bardon JC, Nosedá RP, Afranchino L, Falzone E, Lager L, et al. Encefalitis bovina por virus herpes. V Congreso Argentino de Virología; 1996; Tandil, Bs. As., Argentina. p 10.
- 51- Di Santo MI, Jorge MC, Catena MC, Estela ES, Ardo DA. Rinotraqueitis infecciosa bovina. *Therios.* 1995; 24, (123): 143-166.
- 52- Fort MC, Iburguren C, Buseti MR, Esain F, Perez LR. Prevalencia de anticuerpos contra el herpes virus bovino-1 (BHV-1) en la población bovina de dos departamentos de la Provincia de La Pampa. V Congreso Argentino de Virología; 1996; Tandil, Bs As, Argentina. p. 53.

- 53- Schudel A. Herpesvirus bovino-1 como agente etiológico de encefalitis en bovinos. *Rev. Med. Vet.* 1984, 65 (3): 168-172.
- 54- Schudel AA, Carillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *J. Vet. Med. B.* 1996; 33: 303-310.
- 55- Valera AR, Costa EF, Traveria G, Alvarado Pinedo MF, Galosi CM. Herpesvirus bovino diagnosticado de un brote de meningoencefalitis. Descripción de un caso de la Provincia de Buenos Aires. XXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría, 1999, Paisandú, Uruguay; p. 33-35.
- 56- Ashbaugh SE, Thompson KE, Belknap EB, Schultheiss PC, Chowdhury S, Collins JK. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diag. Inv.* 1997; 9: 387-394.
- 57- Flores EF, da Silva AM, Weiblen R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo-5 (HBV-5). Simpósio Internacional sobre herpesvírus bovino (tipo1 e 5) y virus da diarreia viral bovina(BVDV). Santa Maria, RS. Brasil, 1998; p.127-137.
- 58- Furuoka H, Izumida N, Horiuchi M, Osame S, Matsui T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.* 1995; 90: 565-571.
- 59- Misra V, Blumenthal RM and babiuk LA . Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis virus) *J. Virol.* 1981; 40: 367-378.

- 60- Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck TM, Loepfe E, Wyler R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 1986; 6 (86/87): 57-73.
- 61- Tikoo S, Campos M, Babiuk L. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Adv. Virus. Res.* 1995; 45: 191-223.
- 62- Pidone CL, Galosi CM, Echeverría MG, Noretto EO, Etcheverrigaray ME. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1999; 46 (7): 453-456.
- 63- Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious bovine rhinotracheitis/ vulvovaginitis BHV-1. In: G Wytman and Becker, editores. *Herpesvirus disease of cattle, horses and pig. Developments in veterinary virology ser.* Boston, USA: Kluwer Academic Publishers; 1989. p. 1-72.
- 64- Romera SA. Inmunomodulación de la respuesta inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus bovino-1 in vivo. [Tesis de doctorado]. Universidad de Buenos Aires. 2001.
- 65- Bulach DM, Studdert MJ. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1 and buffalo herpesvirus. *Arch. Virol.* 1990; 113: 17-34.
- 66- Plummer G, Goodheart CR, Henson D, Bowling CP. A comparative study of the DNA density and behaviour in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virol.* 1969; 39: 134-137.

- 66- Studdert MJ. A brief review of studies of bovine and equine herpesvirus. *Aust. Vet. J.* 1989; 66 (12): 401-402.
- 67- Okazaki K, Kawakura H, Okada M, Honda E, Minetoma T, and Kumagai T. Intracellular Localization and Transport of Three Different Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins Involved in Neutralization. *Arch. Virol.* 1987; 92: 17-26.
- 68- Okazaki K, Honda E, Kono Y. Expression of Bovine Herpesvirus-1 Glycoprotein GIII by a Recombinant Baculovirus in Insect Cells. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: (Pt 4): 901-904.
- 69- Fitzpatrick DR, Zamb T, Parker MD, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Lawman MJP. Expression of Bovine Herpesvirus 1 Glycoproteins gl and gIII in Transfected Murine Cells. *J. Virol.* 1988; 62 (11): 4239-4248.
- 70- Fitzpatrick DR, Redmond MJ, Attah-Poku SK, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Zamb TJ. Mapping of 10 Epitopes on Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins gl and gIII. *Virology.* 1990; 176: 145-157.
- 71- McLain DS and Fuller AO. Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virol.* 1994; 198: 690-702.
- 72- Okasaki K, Honda E, Minetoma T. and Kumagai T. Bovine herpesvirus type 1 gp87 mediates both attachment of virions to susceptible cells and hemagglutination. *Arch. Virol.* 1987; 97: 297-307.
- 73- Schwyzer M and Ackermann M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 1996; 53: 17-29.

- 74- Whitbeck JC, Bello LJ, Lawrence WC. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type I gB gene. *J. Virol.* 1988; 62: 3319-3327.
- 75- Van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk LA. Synthesis and Processing of Bovine Herpesvirus 1 Glycoproteins. *J. Virol.* 1986; 59 (2): 401-410.
- 76- Jacobs L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Arch. Virol.* 1994; 137: 209-228.
- 77- Okazaki K, Matsuzaki T, Sugahara Y, Okada J, Hasebe M, Iwamura Y, et al. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein III with Heparinlike moiety on the cell surface. *Virol.* 1991; 181: 666-670.
- 78- Kit S, Otsuka H, Kit M. Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine. *J. Virol. Meth.* 1992; 40: 45-56.
- 79- Li Y, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Liang X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J. Virol.* 1995; 69 (8): 4758-4768.
- 80- Van Drunen Littel-van den Hurk S, van Donkersgoed J, Kowalski J, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA, et al. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesviruses-1 in cattle. *Vaccine.* 1994; 12 (14): 1295-1302.
- 81- Hughes G, Babiuk LA and van Drunen Littel-van den Hurk. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch. Virol.* 1988; 103: 47-60.

- 82- Chase CCL and Letchworth GJ. Bovine Herpesvirus-1 GIV-Expressing Cells Resist Virus Penetration. *J. Gen. Virol.* 1994; 75 (Pt 1): 177-181.
- 83- Dubuisson J, Israel BA, Letchworth GJ. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Gen. Virol.* 1992; 73 (Pt 8): 2031-2039.
- 84- Hurk H and Van Drunnen Little van-der Hurks S. Antigenic and immunogenic characteristics of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins Gvp 3/9 and G/v/p 6/11/16 purified by immunoabsorbent chromatography. *Virol.* 1988; 144 (1): 204-215.
- 85- Hutchings D, Van Drunnen Little van-der Hurks S, Babiuk L. Lymphocyte responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *J. Virol.* 1990; 64 (10): 4866-4872.
- 86- Van Drunen Littel-van den Hurk S, Gifford G, Babiuk L. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual BHV-1 glycoproteins. *Vaccine.* 1990; 8 (4): 358-368.
- 87- Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur J H, Osorio FA, Kennedy G et al. Neuropathology of Bovine Herpesvirus Type 5 (BHV-5) Meningo-encephalitis in rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 1997; 117: 4.
- 88- Chowdhury SI, Lee BJ, Ozkul A, Weiss ML. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 2000; 74 (5): 2094-2106.

- 89- Fuller AO and Lee WC . Herpes simple virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and GH in penetration. *J. Virol.* 1992; 66: 5002-5012.
- 90- Wild P, Schraner EM, Peter J, Loepfe E, Engels M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. *J. Virol.* 1998; 72 (12): 9561-9566.
- 91- Ludwig GV and Letchworth GJ. Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoprotein synthesis. *J. Virol.* 1987; 61: 3292.
- 92- Ackerman M and Wyler R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 1984; 9: 53-59.
- 93- Bratanich AC and Jones CJ. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J. Virol.* 1992; 66 (10): 6099-6106.
- 94- Delhon G, González MJ, Murcia PR. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (9): 2257-2267.
- 95- Pastoret PP and Thiry E Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis : the role of virus latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1985; 8: 35-42.
- 96- Thiry E, Saliki J, Bublot M, Pastoret P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immun. Microbiol. and Infec. Dis.* 1987; 10 (1): 59-63.

- 97- Derbyshire JB and Caplan BA. The isolation and characterization of an strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from stillbirth in swine. *Can. J. Comp. Med.* 1976; 40: 252-286.
- 98- Porter DD, Larsen AE, Cox NA . Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from Mustelidae. *J. Clin. Microbiol.* 1975; 1: 112-113.
- 99- Smith PC. Experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infections of English ferrets (*Mustela putorius furo* L). *Am. J. Vet. Res.* 1978; 39: 1369-1372.
- 100- Lupton HW, Barnes H J, Reed DE. Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet.* 1980; 70 (1): 77-95.
- 101- Mohanty SB, Lilie MG, Corselius NP, Beck DJ. Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in goats. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1972; 160: 879-880.
- 102- Radostits OM, Gay CG, Blood DC, Hinchcliff KW. Rinotraqueítis bovina infecciosa (Infección por Herpes virus bovino de tipo 1). In: *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* 9º ed. Madrid, Mc Graw Hill-Interamericana 2002; Vol II; p. 1390-1402.
- 103- Engels M and Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 1996; 53: 3-15.
- 104- Miller JM, Van der Maaten MJ, Whetstone CA. Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: Classification as a type-2

(infectious pustular vaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 49 (10): 1653-1656.

105- Thielscher H. and Huth F. IBR/IPV: Vaccination or Culling?. *Landbauforschung Völkenrode.* 1986; 36: 171-176.

106- Barenfus M, Delli Quadri CA, McIrtire RW, Schroeder RJ. Isolation Of infectious bovine rhinotracheitisvirus from calves with meningoencephalitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1963; 143: 725- 728.

107- Bartha A, Juhasz M, Liebermann H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory diseases and keratoconjunctivitis. *Acta Med. Acad. Scien. Hung.* 1966; 65: 357.

108- Ludwig H. The herpesviruses. Vol. 2 . New York: Plenum press. 1983; p. 135-214.

109- d'Offay JM, Mock RE, Fulton RW. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 1993; 54 (4): 534-539.

110- Kendrick WK. Effects of the infectious bovine Rhinotracheitis virus on the fetus. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1973; 163: 852-854.

111- Smith KC. Herpesviral abortion in domestic animals. *Review. Vet. J.* 1997; 153: 253-268.

112- Narita M, Inul S, Murakami Y, Nanba K and Shimizu Y. Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Path.* 1982; 92: 41-49.

- 113- Potgieter ND, Mc Cracken MD, Hopkins FM, Walker R. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 1984. 45 (4): 687-690.
- 114- Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (8): 2498-2507.
- 115- Nyaga PN and Mc Kercher DG . Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1980; 2: 587-602.
- 116- Bielefeldt OH and Babiuk LA. Viral bacterial pneumonia in calves: effect of bovine herpesvirus-1 on immunological functions. *J. Infect. Dis.* 1985; 151: 937-947.
- 117- Winkler MTC, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4+ T lymphocytes and induced programmed cell death during acute infection of cattle. *J. Virol.* 1999; 73: 8657-8668.
- 118- Miller JM, Whetstone CA, Bello LJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52 (7): 1038-1043.
- 119- Studdert MJ. A brief review of studies of bovine and equine herpesvirus. *Aust. Vet. J.* 1989; 66 (12): 401-402.
- 120- Kahrs RF. Infectious Bovine Rhinotracheitis: A review and update. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1977; 171 (10): 1055-1064.

- 121- Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 1996; 53 (1-2): 31-42.
- 122- van Drunen Littel-van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 2006; 113: 275-282.
- 123- Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 2006; 113: 293-302
- 124- Muylkens B, Meurens F, Schynts F, de Fays K, Pourchet A, Thiry J, Vanderplasschen A, Antoine N, Thiry E. Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet. Microbiol.* 2006; 113: 283-291.
- 125- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 2007; 38: 181-209.
- 126- Straub O, Mawhimmey I. Vaccination to protect calves against Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 1988; 122: 407-411.
- 127- Zigraich N, Lobman M, Vasdcoboinic E. In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Rev. Vet. Sci.* 1974; 16: 328-335.
- 128- Gilliam SE, Thackray AM, Brown GA, and Field HJ. The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in the natural host. *Arch. Virol.* 1993; 128: 43-54.
- 129- Bryan LA, Fenton RA, Misra V, Haines DM. Fatal generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine

rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Can. Vet. J.* 1994; 35: 223-228.

130- Nettleton PF and Sharp JM. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet. Rec.* 1980; 107: 379.

131- Tood JD. Development of intranasal vaccination for the immunization of cattle against infectious bovine rhinotracheitis. *Can. Vet. J.* 1974; 15: 257-259.

132- Mc. Kercher DG, Bibrack B, Richards WPC. Comparative efficacy of intranasally and parenterally administered infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1971; 159: 1362-1369.

133- Frerichs GN, Woods SB, Lucas MH, Sands JJ. Safety and efficacy of live and inactivated infectious rhinotracheitis vaccines. *Vet. Rec.* 1982; 111: 116-122.

134- Smitsaart EN, Bratanich AC, Ruiz M, Blanco Viera FJ, León E, González O, et al. Comportamiento inmunogénico de vacunas inactivadas polivalentes para Herpesvirus Bovino 1. *Rev. Med. Vet.* 1987; 68 (3): 148-154.

135- Babiuk LA, Potter AA. Veterinary Vaccines. *Biotechnol. Adv.* 1994; 12 (3): 489-523.

136- Van Drunen Littel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA, et al. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine* 1993; 11(1): 25-35.

137- Ayers VK, Collins JK, Purdy CW. Epitope-specific antibody-responses in market-stressed calves to bovine herpesvirus type 1. *Vaccine.* 1994; 12 (10): 940-946.

- 138- Rock DL, Hagemoser WA, Osorio FA, Reed DE. Detection of bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglio of latently infected rabbits by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* 1986; 67 (Pt 11): 2515-2520.
- 139- Rock DL, Beam SL, Mayfield. Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits. *J Virol.* 1987; 61(12): 3827-31.
- 140- da Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehe PM et al. Patogénesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Rev. Microbiol.* 1999; 30 (1): 22-31.
- 141- Meyer G, Lemaire M, Lyaku J, Pastoret PP, Thiry E. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute Infection. *Vet. Microbiol.* 1996; 51: 27-40.
- 142- Nilzane B, da Silva AM, Brum MCS, Canto MC, Weiblen R, Roehe PM, Flores EF. Neuropatogenicidade de Herpesvirus Bovino 1 tipo 5 (BHV-5): Avaliação de Ovinos e Coelhos como Modelos Experimentais. VI Jornadas de Jóvenes Investigadores Grupo Montevideo , 1998; Santa Fé, Argentina.
- 143- Lee BJ, Weiss ML, Mosier D, Chowdhury SI. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J. Neurovirol.* 1999; 5: 474-84.
- 144- Rock DL, Reed DE. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model. *Inf. and Immun.* 1982; 35 (1): 372-373.

- 145- Spilki FR, Esteves PA, Fanco AC, Lima M, Holz CL, Batista HBR, et al. Neurovirulencia e neuroinvasividade de herpesvirus bovnos tipo 1 e 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Braz.* 2002; 22 (2): 58-63.
- 146- Beltrão N, Flores EF, Weiblen R, da Silva AM, Roehe PM, Irigoyen LF. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesq. Vet. Brás.* 2000; 20 (4): 144-150.
- 147- Osorio FA, Reed DE, Rock DL. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet. Microbiol.* 1982; 7: 503-513.
- 148- Naeem K, Murtaugh MP, Goyal SM. Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 1991; 119: 239-255.
- 149- Naeem K, Caywood DD, Werdin RE, Goyal SM. Evaluation of pregnant rabbits as a laboratory model for bovid herpesvirus-4 infection. *Am. J. Vet. Res.* 1990; 51 (4): 640-644.
- 150- Hill JM, Garza HH, Helmy MF, Cook SD, Osborne PA, Johnson EM et al. Nerve growth factor antibody stimulates reactivation of ocular herpes simplex virus type 1 in latently infected rabbits. 1997; *J. Neurovirol.* 3: 206-211.
- 151- Honda E, Taniguchi T, Watanabe M, Kumagai T. Detection of bovine rhinotracheitis virus antibody by neutralizing test and ELISA in experimentally infected rabbits. *J. Vet. Med. B.* 1991; 38: 55-59.
- 152- Brown GA and Field HJ. A reliable method for establishing viral infection in the rabbit by intranasal inoculation. *J. Virol. Methods.* 1990; 27 (3): 341-346.

- 153- Kelly DF. Experimental infection of rabbits with the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Braz. J. Exp. Pathol.* 1977; 58: 168-176.
- 154- Walker C, Love DN, Whalley JM, Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Vet. Microbiol.* 1999; 68: 3-13.
- 155- Inazu M, Tsuha O, Kirisawa R, Kawakami Y, Iwai H. Equid herpesvirus-1 infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 1993; 55: 119-121.
- 156- Van Woensel PAM, Goovaerts D, Markx D, Visser N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpesvirus-1 strains. *J. Virol. Meth.* 1995; 54: 39-49.
- 157- Iwai H, Koder A, Sekiya N, Nakamura A, Kirisawa R. Effect of Equid herpesvirus 1 infection on parturition of mice. *J. Eq. Vet. Sci.* 1998; 9: 25-27.
- 158- Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva SG, et al. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Vet. Microbiol.* 2004; 103: 1-12.
- 159- Lison, L. *Estadística aplicada a la biología experimental.* 1ra. Edición. Buenos Aires: Editorial EUDEBA; 1976.
- 160- Sokal RR, and Rohlf FJ. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research.* 2° ed. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Company, 1981; p 859.
- 161- Cunningham H.C. Editor. *Virología Práctica.* 6° Ed traducida. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1971.

- 162- Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. XVII Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lección de Histoquímica y Microscopía electrónica. La Plata, Bs As, Argentina, 2005.
- 163- Valera AR, Galosi CM, Echeverría MG, Silvestrini MP, Romero JR, Nosetto EO. Desarrollo y Estandarización de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino tipo 1. *Avances en Medicina Veterinaria*. 1999; 13 (1): 21-24.
- 164- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Manual of Diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.3.5. www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_INDEX.HTM
- 165- Alegre M. Diagnóstico Molecular de Herpes bovino. Tesis de doctorado Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2006
- 166- Márquez Rosa de Jesús. Determinación de la cultura sobre el uso de los animales de laboratorio existentes en los investigadores de la Universidad de los Andes. [Tesis doctoral]. Mérida. Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 1997.
- 167- Marshall's Physiology of reproduction. Placentation Chapter 15. Parker AS, edit. Longmans, Green and Co Editores, Vol II; London; 1964. p. 243-275.
- 168- Owen NV, Chow TL, Molello JA. Bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1964; 25: 1617-1626.
- 169- Björkman N, Dantzer V, and Leiser R. Comparative placentation in laboratory animals. A review. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* N° 4. 1989; 16.